

# **Epigenetikus szabályozó faktorok azonosítása és jellemzése *Drosophila melanogaster*-ben**

Ph.D. értekezés

**Honti Viktor**

**Témavezető: Dr. Gyurkovics Henrik**

**Magyar Tudományos Akadémia**

**Szegedi Biológiai Központ**

**Genetikai Intézet**

**Biológia Doktori Iskola**

**Szegedi Tudományegyetem**

**Természettudományi és Informatikai Kar, Genetikai Tanszék**

**Szeged, 2009.**

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>1</b>	<b>BEVEZETÉS</b>	<b>5</b>
1.1	Általános bevezetés és célkitűzés	5
1.2	Irodalmi áttekintés és tudományos háttér	10
1.2.1	A <i>bithorax</i> -komplex	10
1.2.1.1	A <i>bithorax</i> -komplex felépítése és működésének modellje	10
1.2.1.2	A <i>bithorax</i> -komplex génjei	12
1.2.1.3	A <i>bithorax</i> -komplex <i>cisz</i> -regulátorai	12
1.2.1.4	A <i>cisz</i> -regulátorok működése	14
1.2.1.5	A <i>bithorax</i> -komplex mutációi	16
1.2.2	Az aktív és inaktív kromatinszerkezet szerepe a BX-C regulációjában	19
1.2.2.1	Az aktív és inaktív kromatinkonformáció	19
1.2.2.2	A <i>Polycomb</i> -csoport	20
1.2.2.3	A PRE és a POLYCOMB-gátlás kapcsolata	25
1.2.2.4	A <i>trithorax</i> -csoport és a TRE	27
1.2.2.5	A <i>Fab-7</i> régió: boundary és PRE	30
1.2.2.6	A <i>Fab-7</i> <sup>2</sup> mutáció <i>Polycomb</i> - és <i>trithorax</i> -gének mutációinak hátterében	31
1.2.3	Transzreguláció és transzvekción	32
1.2.3.1	A transzvekción fogalma	32
1.2.3.2	A <i>Fab-7</i> <sup>1</sup> mutáció <i>Polycomb</i> - és <i>trithorax</i> -gének mutációinak hátterében	33
1.2.3.3	Transzvekción vizsgálata PRE-transzgénekkel	34
1.2.3.4	PRE-transzgének viselkedése a fenntartó rendszer mutációinak hátterében	35
1.2.4	A POLYCOMB-gátlás eddig ismeretlen tulajdonságai	36

<b>2</b>	<b>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b>	<b>38</b>
2.1	<i>Drosophila</i> tenyészet és törzsek	38
2.2	A 18.73.1 és a 102.103.2 transzgén	38
2.3	Általános módszerek	39
2.3.1	EMS mutagenézis	39
2.3.2	Komplementációs analízis	39
2.3.3	Röntgen reverziós kísérletek	40
2.3.4	Röntgen-indukált mutagenézis	40
2.3.5	A kromoszóma-preparátumok készítése	40
2.3.6	P-elem mobilizálása funkcióvesztéses <i>bonus</i> allélok előállítása céljából	41
2.3.7	A <i>RUCU</i> térképező kromoszóma előállítása	41
2.3.8	Meiotikus térképezés	42
2.4	Molekuláris genetikai módszerek	43
2.4.1	Kompetens sejtek készítése	43
2.4.2	Kompetens sejtek transzformálása	44
2.4.3	Plazmid miniprep készítése forralásos módszerrel	44
2.4.4	A plazmid miniprep tisztítása	45
2.4.5	Transzgenikus konstrukciók klónozása	45
2.4.5.1	A pBluescript-FRTs vektor létrehozása	45
2.4.5.2	A <i>Fab-7</i> HindIII-HindIII fragmentből származó kisebb fragmentek szubklónozása	46
2.4.6	<i>In situ</i> hibridizáció lárvális nyálmirigy óriáskromoszómán	46
<b>3</b>	<b>EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK</b>	<b>48</b>
3.1	Mutánsizolálási kísérletek leírása	48
3.1.1	Mutánsizolálási kísérlet a 18.73.1 transzgenikus konstrukció felhasználásával	49

3.1.2	Reverziós kísérletek.....	51
3.1.3	Mutánsizolálási kísérlet a 102.103.2 transzgenikus konstrukció felhasználásával.....	52
3.1.4	A mutánsizolálási kísérletek során tett megfigyelések.....	56
3.2	A kísérletek során izolált érdekesebb mutációk további vizsgálata.....	59
3.2.1	Ellentmondásos fenotípust mutató funkcióvesztéssel mutációk.....	59
3.2.2	<i>Piros szem (Pis)</i> (CG16975).....	61
3.2.3	<i>Fehér szem (Fes)</i> .....	63
3.2.4	<i>grappa</i> <sup>94A</sup> .....	64
3.2.5	<i>bonus</i> <sup>117A</sup> .....	66
3.2.6	Egyéb, röntgen-reverzióval alátett mutációk (10, 10A/2, 15, 21 és 24).....	72
3.2.6.1	A 10 jelű mutáció.....	72
3.2.6.2	A 10A/2 jelű mutáció.....	73
3.2.6.3	A 15 jelű mutáció.....	73
3.2.6.4	A 21 jelű mutáció.....	74
3.2.6.5	A 24 jelű mutáció.....	74
3.2.7	<i>msl</i> (male-specific lethal) mutációk.....	75
3.3	Új transzgenikus konstrukciók létrehozása.....	75
4	<b>AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA</b> .....	79
5	<b>AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA</b> .....	82
	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....	90
	<b>IRODALOMJEGYZÉK</b> .....	93
	<b>ÖSSZEFOGLALÓ</b> .....	119
	<b>SUMMARY</b> .....	125

## 1 BEVEZETÉS

### 1.1 Általános bevezetés és célkitűzés

A magasabbrendű eukarióta szervezetek minden egyes sejtje ugyanazt a genetikai információt hordozza, ám ez a különböző sejtekben különféle módon használdik fel. A különböző sejtek fejlődési programjuknak megfelelően epigenetikus faktorok segítségével különböző géneket expresszálnak, vagy kapcsolnak ki. Ha ez a specifikus génexpressziós mintázat időben vagy térben nem megfelelően jön létre, a morfológiai fejlődés hibákat szenvedhet. A fejlődésbiológia, azon belül is a fejlődésgenetika fő feladata azon genetikai szabályzási utak feltérképezése, amelyek a különböző sejtvonalak génexpressziós mintázatát időben és térben kialakítják, illetve fenntartják, így biztosítva a sejtek determinációját, illetve a későbbi feladatokra való specializációját.

A génexpresszió epigenetikus determinációjának létrejöttéhez elengedhetetlen a korai morfogén faktorok megfelelő eloszlása, ez azonban nem elegendő a zavartalan biokémiai és morfológiai differenciálódáshoz, a korai faktorok által kialakított génexpressziós mintázatot időben és térben fenn kell tartani az egyedfejlődés során.

Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) nagyon hasznos modellnek bizonyult ahhoz, hogy megérthessük a sejtek korai determinációjának, illetve a létrejött génexpressziós mintázat fenntartásának mechanizmusait. Az is bebizonyosodott, hogy az ecetmuslica egyedfejlődéséről szerzett ismeretek hatékonyan hozzájárulnak az emlősök egyedfejlődésének genetikai szempontból való vizsgálatához, mert nem csupán a génexpressziós mintázat fenntartásának mechanizmusa hasonló az ecetmuslicában és az emlősökben, de ezen mintázat megőrzését biztosító epigenetikus faktorok is homológiát mutatnak.

A korai *Drosophila* embrióban a determinációt anyai hatású morfogén faktorok gradiensei indítják el. Ezek a faktorok az embrió anterior és poszterior, illetve dorzális és

ventrális részein eltérő mintázatban kapcsolják be a zigóta *gap*-génjeit. A *gap* gének eltérő mintázatu aktivitásának a következménye a *pair rule*-, illetve szegment polaritási gének megfelelő helyen és időben való aktiválódása. A korai zigotikus faktorok differenciális expressziója vezet a homeotikus gének szelvény-specifikus kifejeződéséhez (**1.2.1.4 fejezet**).

A homeotikus gének olyan konzervált mestergének (transzkripciós regulátorok), melyek az egyedfejlődés során korán bekapcsolnak, és mindvégig aktívak maradnak. Expressziójuk szelvény-specifikus, szerepük az, hogy az általuk szabályozott végrehajtó géneken keresztül kialakítsák az adott szelvény identitását.

A *Drosophila melanogaster* homeotikus génjei két nagy homeotikus génkomplexet alkotnak. Az *Antennapedia*-komplex (ANT-C) a fejtől a középtorig, a *bithorax*-komplex (BX-C) a középtortól hátrafelé elhelyezkedő szelvények identitásának kialakításáért felelős (**1.2.1.1 fejezet**).

A BX-C három homeotikus gént kódol (*Ultrabithorax*, *abdominal-A*, *Abdominal-B*), melyek a komplex hatása alatt álló kilenc szelvény identitását nagy kiterjedésű, szelvény-specifikus *cis*-regulátor elemek segítségével képesek meghatározni (**1.2.1.2 és 1.2.1.3 fejezetek**). Minden egyes szelvényben egy újabb *cis*-regulátor elem kapcsol be (válíkt aktívvá a kromatinszerkezete), és ennek hatására egy újabb homeotikus gén aktiválódik, vagy az előző szelvényben is aktív homeotikus gén expressziós szintje emelkedik meg (**1.2.1.4 fejezet**).

Ahhoz, hogy a homeotikus gének korán kialakult expressziós szintje változatlan maradjon a teljes egyedfejlődés során, két nagy géncsoport által kódolt fehérjék járulnak hozzá. A POLYCOMB-csoportba (PCG) tartozó fehérjék a *cis*-regulátorok inaktív állapotának (zárt kromatinkonformációjának) fenntartásáért felelősek, míg a TRITHORAX-csoport (TRXG) tagjai az aktív *cis*-regulátorok (nyílt kromatinkonformációjú) állapotát tartják fenn (**1.2.2 fejezet**).

A *Polycomb*-gének dózisának csökkenése a *bithorax*-komplex funkciónyerésének megfelelő fenotípust okoz (minden szelvény a mögötte elhelyezkedő szelvényre hasonlít), míg a *trithorax*-csoport mutánsai a *bithorax*-komplex funkcióvesztéses fenotípusát alakítják ki (minden szelvény az előtte elhelyezkedő szelvényre hasonlít). A *Polycomb*- illetve *trithorax*-csoport tagjai egymással genetikai kölcsönhatást mutatnak: azonos csoportba eső gének mutációi egymás fenotípusát általában erősítik, míg az ellentétes hatású gének mutációi szuppresszálják egymást. A POLYCOMB, illetve TRITHORAX-csoportba tartozó fehérjék támadáspontja a homeotikus gének *cisz*-regulátoraiban található PRE- (Polycomb Response Element), illetve TRE-szakaszok (TRE: Tritheorax Response Element) (1.2.2.2, 1.2.2.3 és 1.2.2.4 fejezetek).

A *Polycomb*- és *trithorax*-csoport génjeit eddig leginkább az általuk okozott homeotikus fenotípus alapján, illetve az egyes mutációk egymásra gyakorolt erősítő vagy gyengítő hatása alapján izolálták. A *Polycomb*- és *trithorax*-csoport eddig ismeretlen tagjainak azonosítása céljából laboratóriumunkban használtunk olyan érzékenyített rendszert (*Fab-7<sup>2</sup>*; *Frontabdominal-7<sup>2</sup>*) is, mely a *bithorax*-komplex egy szenzitív mutációja révén alkalmas a homeotikus működést fenntartó gének dózisának változásait érzékelni (1.2.2.5 és 1.2.2.6 fejezetek). A különféle érzékenyített rendszerek (pl. *Mcp* és *Fab-7<sup>2</sup>*) más és más POLYCOMB- és TRITHORAX-fehérjék mennyiségére érzékenyek.

A *bithorax*-komplex különböző szakaszait tartalmazó transzgenikus konstrukciók egy újabb lehetőséget nyújtanak a *Polycomb*- és *trithorax*-csoportba tartozó gének hatásának és specificitásának feltérképezésére. A *cisz*-regulátorokban található silencer-elemet hordozó transzgenikus konstrukciók hajlamosak a genomikus, endogén PRE szakaszok közelébe beépülni (homing), és azokkal kölcsönhatva a transzgenikus konstrukcióban található riportergén transzkripciójának gátlását kialakítani. Ha a PRE-t tartalmazó transzgént a legyek homozigóta formában hordozzák, akkor a genomikus PRE közreműködése nélkül is létrejön a

transzkripció gátlás (PSS: Pairing Sensitive Silencing). A PRE szakaszokon keresztül megvalósuló párosodás-érzékeny gátlás érzékeny az adott PRE szakaszon ható POLYCOMB-fehérjék mennyiségére, így transzgenikus konstrukciók segítségével lehetőség van az egyes POLYCOMB-fehérjék PRE-specifitásának vizsgálatára (**1.2.3.3 és 1.2.3.4 fejezetek**).

A PRE szakaszt tartalmazó transzgenikus konstrukciók lehetőséget nyújtanak a *Polycomb*-, illetve *trithorax*-csoport eddig ismeretlen tagjainak azonosítására is. Ez azért is előnyös, mert az irodalmi adatok azt sugallják, hogy több *Polycomb*-gén létezik, mint amennyit eddig megismertünk, és a párosodás-érzékeny gátlás transzgenikus módszerrel való vizsgálata nagyon érzékeny a PRE szakaszon ható gének dóziséra. A transzgenikus módszer azt is lehetővé teszi, hogy szűkítsük, illetve bővítsük azt a DNS szakaszt, amelyre ható faktorokat izolálni kívánunk.

Laboratóriumunkban kutatási célul tűztük ki, hogy EMS és röntgen mutagenézis során olyan mutációkat keresünk, melyek módosítják a *white enhancer::iab-7 PRE::miniwhite* transzgenikus konstrukciókat homozigóta formában hordozó egyedek szemszínét, majd az így izolált mutációkat komplementációs analízisnek vetjük alá, és az ismeretlennek bizonyuló mutációkat genetikailag jellemezzük.

Céljaink között szerepelt az is, hogy a funkciónyeréses mutációkat röntgensugárzással revertáljuk, és a citológiai pozíciójukat megállapítsuk. A revertánsok funkcióvesztéses fenotípusából következtetni lehet a mutáns gén vad funkciójára, a kromoszómákon található átrendeződésekből pedig az ismeretlen gén lokalizációjára.

Kísérleteinkben szerettünk volna információt nyerni arról is, hogy a különböző PRE szakaszokon felépülő POLYCOMB-komplexek eltérnek-e egymástól az egyes POLYCOMB-fehérjéket tekintve. Meg kívántuk állapítani több, régebben ismert, és néhány általunk izolált mutáció PRE specificitását. Ezen kérdések megválaszolása segíthet bővíteni, illetve



pontosabbá tenni a *Polycomb*- és *trithorax*-csoportba tartozó gének működéséről kialakított modellünket.

Kísérleteink során arra is fény derült, hogy a korábban általunk, illetve mások által használt konstrukcióknak számos gyengéje van. Egyrészt nem teszik lehetővé, hogy az endogén PRE-k hatását izoláljuk a párosodás-érzékeny gátlás jelenségétől, így megzavarják a POLYCOMB-fehérjék PRE-specifikus hatására irányuló vizsgálatainkat. Másrészt - mivel többnyire a riporter gén enhanszerét is tartalmazzák – a PRE és a konstrukcióban található enhanszer kölcsönhatása aspecifikussá teszi a vizsgálatokat. Olyan transzgenikus konstrukciók tervezésére volt tehát szükség, melyekkel az eddigieknél pontosabb kép nyerhető a POLYCOMB-fehérjék működéséről.

Mindezek mellett – mivel kísérleteink elsősorban az *iab-7* PRE szakaszon ható fehérjék megismerésére irányultak -, szükség volt ennek a régióknak a felbontására, hogy a későbbiekben megállapíthassuk, hogy az egyes fehérjék hatásához mely DNS szakaszok szükségesek elengedhetetlenül. Korábbi genetikai kísérleteink szerint az *iab-7* PRE közelében található egy TRE is, melynek kölcsönhatása a vizsgált PRE-szakasszal csak részben ismert. Az új konstrukciókat úgy kívántuk elkészíteni, hogy alkalmasak legyenek a fent említett kérdések megválaszolására.

Munkánk egyik fő célja tehát az volt, hogy új funkciónyeréses és funkcióvesztéses mutációkat izoláljunk, melyek azon túl, hogy lehetővé teszik a *Polycomb*-, illetve *trithorax*-csoport eddig ismeretlen tagjainak megismerését, segítenek megérteni a homeotikus gének *cisz*-regulátorainak és a rajtuk felépülő fehérjekomplexeknek a működését. Emellett létre kívántunk hozni egy olyan eszközzrendszert, mely lehetővé teszi az *iab-7* PRE és TRE eddigieknél finomabb felbontású vizsgálatát.

## 1.2 Irodalmi áttekintés és tudományos háttér

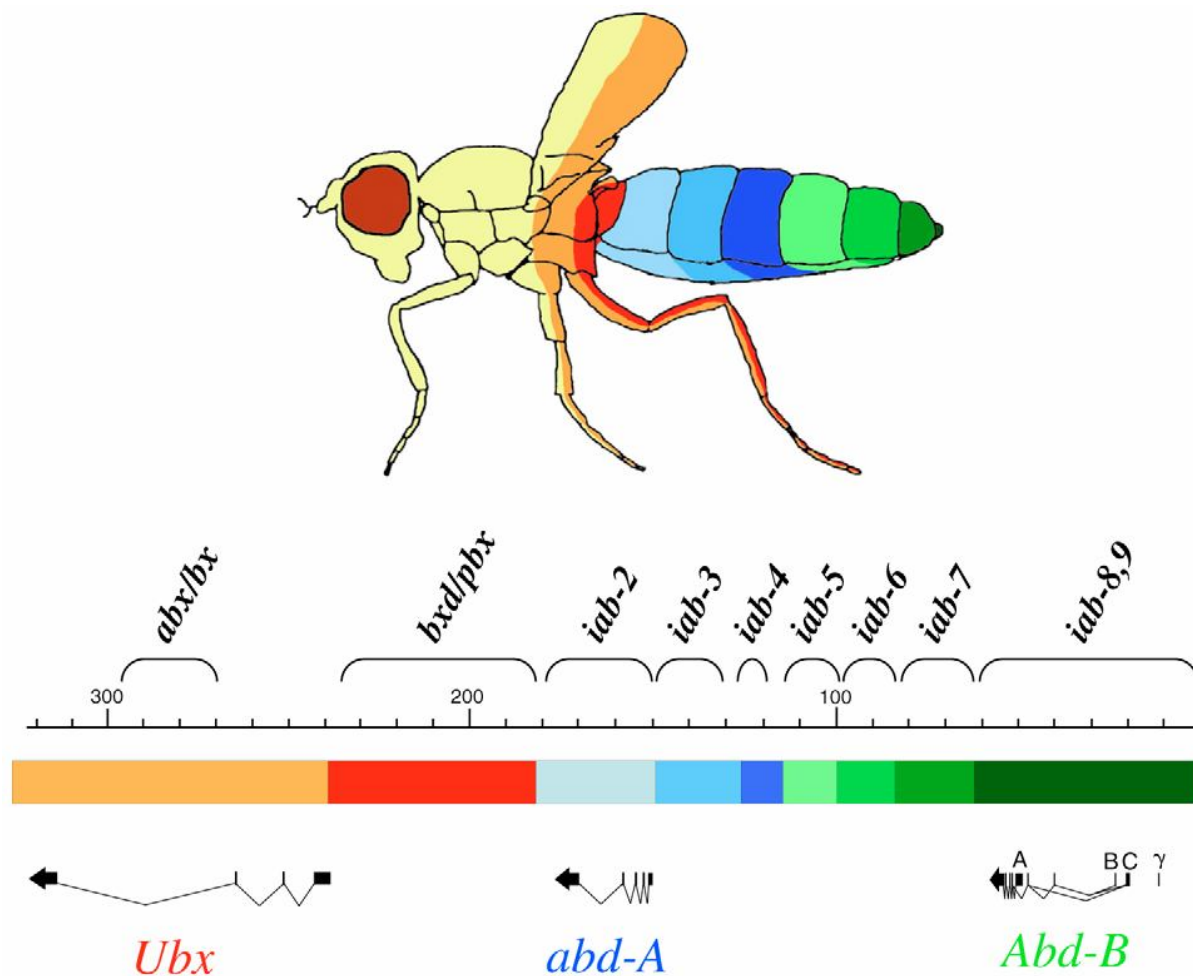
### 1.2.1 A *bithorax*-komplex

#### 1.2.1.1 A *bithorax*-komplex felépítése és működésének modellje

Korai genetikai vizsgálatok arra utaltak, hogy a *bithorax*-komplex kilenc szabályozó gént kódol (*abx/bx* [*anterobithorax/bithorax*], *bxl/pbx* [*bithoraxoid/postbithorax*], *iab*[*infraabdominal*]-2, *iab*-3, *iab*-4, *iab*-5, *iab*-6, *iab*-7, *iab*-8,9) melyek expressziós mintázata megfelel a lárvális paraszegmenteknek (PS5-15) (Lewis, 1978). Lewis modellje szerint ezek a gének az általuk meghatározott lárvális szelvények sorrendjében követik egymást a kromoszómán (kolinearitás). A modell szerint az egyre hátrébb elhelyezkedő szelvényekben mindig egy újabb kapcsol be az általa leírt kilenc gén közül. Ezen gének homozigóta mutációja tehát homeotikus transzformációkhoz – a lárvális szelvények identitásának megváltozásához - vezet.

Későbbi kísérletekből azonban kiderül, hogy a *bithorax*-komplex génjei mindössze három letális komplementációs csoportba sorolhatók (Sanchez-Herrero és mtsai, 1985; Tjong és mtsai, 1985): az *Ultrabithorax* a PS5-6 (pT2-aA1), az *abdominal-A* a PS7-9 (pA1-aA4), az *Abdominal-B* pedig a PS10-14 (pA4-aA9), valamint a PS15 identitásának meghatározásáért felel. Ezen gének expressziós szintje - melyet szelvényt-specifikus szabályozó régiók biztosítanak -, azonban minden szelvényben eltérő. Expressziós doménjük első néhány szelvényében a homeotikus gének expressziós szintje poszterior irányban rendszerint szelvényenként nő. Lewis 1978-as modellje tehát lényegében helytálló volt, azzal a módosítással, hogy az általa leírt kilenc homeotikus gén valójában kilenc szelvényt-specifikus *cisz*-regulátor (**1.1 ábra**). Számos későbbi tanulmány foglalkozott a *bithorax*-komplex három homeotikus génjének és az azokat szabályozó kilenc *cisz*-regulátor régió molekuláris felépítésével (DeLorenzi és mtsai, 1988; Kornfeld és mtsai, 1989; Zavortink és Sakonju, 1989; Karch és mtsai, 1990; Celniker és mtsai, 1990). Martinnak és munkatársainak 1995-re

sikerült a *bithorax*-komplex teljes szekvenálását elvégezni (~315 kb), így ismertté váltak a komplexben kódolt gének és *cisz*-regulátorok szekvenciái. A komplexben kódolt gének mérete a *bithorax*-komplex méretét tekintve elenyésző, a komplex 98%-át a szabályozó régiók teszik ki. Mind a homeotikus gének, mind a *cisz*-regulátorok elhelyezkedése a kromoszómán kolineáris az általuk szabályozott szelvényekkel.



**1.1 ábra** A *bithorax*-komplex molekuláris térképe és *cisz*-regulátorainak aktivitása a kifejllett muslicában

Az ábrán azonos szín jelöli a *bithorax*-komplex egyes *cisz*-regulátorait, illetve azokat a szelvényeket, melyek identitásának kialakításáért felelősek (Maeda és Karch, 2006).

### 1.2.1.2 A *bithorax*-komplex génjei

Az *Ubx* gén (78.1 kb) egy homeodomént tartalmazó fehérjét kódol, mely öt különböző splice-variáns termékeként keletkezik (O'Connor és mtsai, 1988; Kornfeld és mtsai, 1989). Génje az embrióban a PS5-től a PS13-ig fejeződik ki (White és Wilcox 1984). Az *Ubx* génben lévő funkcióvesztéses mutációk jellegzetes fenotípusa a billér szárny irányába történő transzformációja.

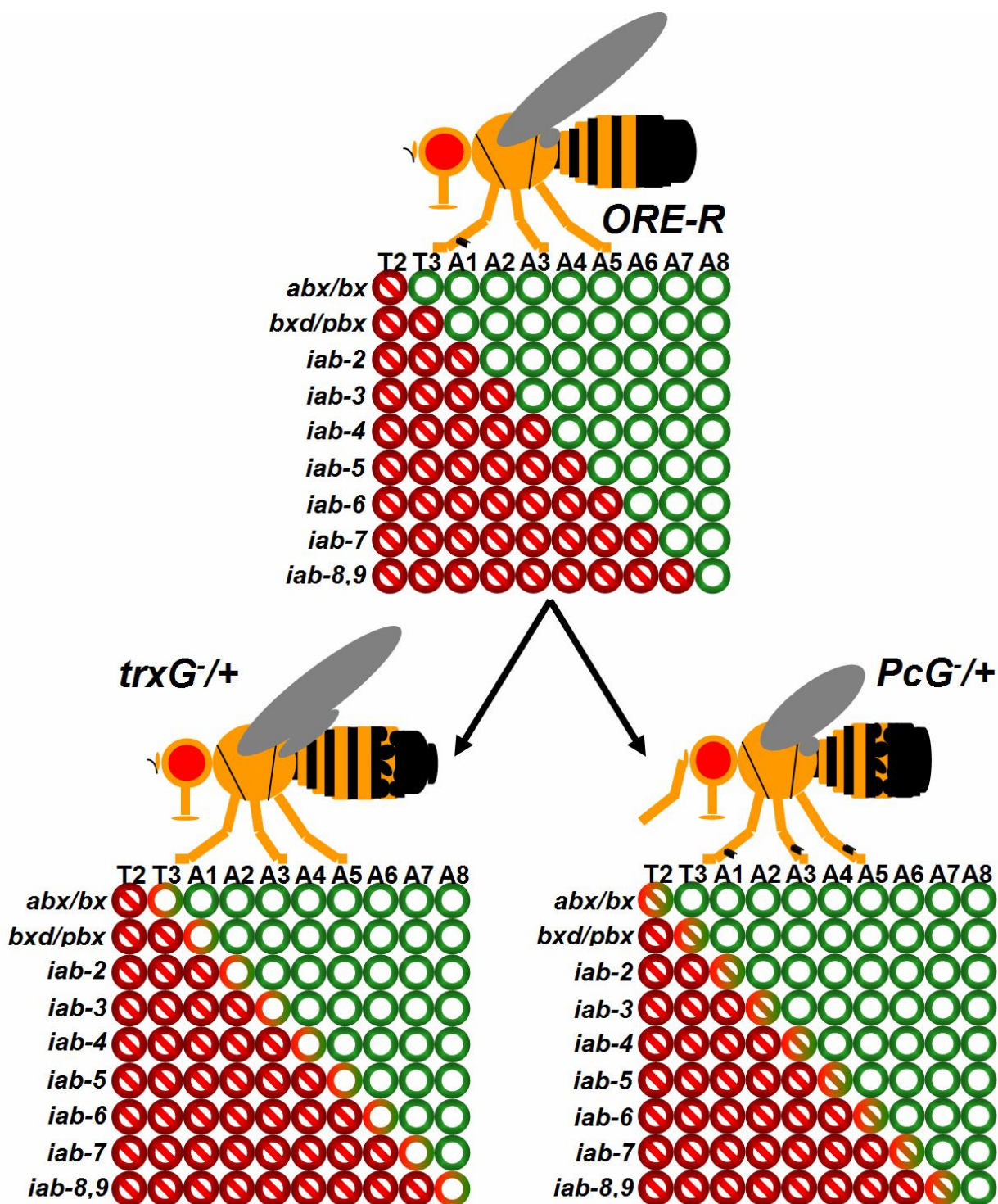
Az *abd-A* gén (22.4 kb) a PS7-től a PS13-ig fejeződik ki, funkcióvesztéses mutációi recesszívek (Karch és mtsai, 1990; Busturia és mtsai, 1989; Macias és mtsai, 1990).

Az *Abd-B* génről (44.6 kb) képződő négy transzkriptum a fehérje két izoformáját kódolja (DeLorenzi és mtsai, 1988; Kuziora és McGinnis 1988a; Zavortink és Sakonju, 1989; Celniker és mtsai, 1990; Boulet és mtsai, 1991). Az „m” izoforma a PS10-től a PS13-ig fejeződik ki, míg az „r” izoforma a PS14 és PS15 szegmentumokban expresszálódik (DeLorenzi és mtsai, 1988; Kuziora és McGinnis 1988; Celniker és mtsai, 1989).

### 1.2.1.3 A *bithorax*-komplex *cisz*-regulátorai

A *cisz*-regulátorok meglehetősen összetett, autonóm működésű, szelvény-specifikus regulátor régiók. Egy-egy *cisz*-regulátor mérete akár 10-20 kb is lehet. Elsődleges funkciójuk a homeotikus gének szelvény-specifikus expressziós mintázatának kialakítása (iniciáció), majd annak fenntartása az egyed egész élete folyamán (Mihály és mtsai, 2006, Akbari és mtsai, 2006).

A módosított Lewis-modellnek megfelelően a középtortól hátrafelé haladva minden újabb szelvényben egy újabb *cisz*-regulátor válik aktívvá. Az aktívvá váló *cisz*-regulátorok az összes hátrébb elhelyezkedő szelvényben is aktívak. Az *abx/bx* (PS5) és a *bxd/pbx* (PS6) az *Ubx*-et (White és Wilcox, 1984), az *iab-2* (PS7), *iab-3* (PS8) és *iab-4* (PS9) az *abd-A*-t (Karch és mtsai, 1990), míg az *iab-5* (PS10), *iab-6* (PS11), *iab-7* (PS12) és *iab-8* (PS13) régiók az *Abd-B*-t szabályozzák (Celniker és mtsai, 1989; Sánchez-Herrero, 1991) (1.1 ábra).



1.2 ábra A *bithorax*-komplex *cis*-regulátorainak aktivitási mintázata

A zöld színű körök az egyes szelvényekben aktív, az áthúzott piros körök az inaktív *cis*-regulátorokat jelölik. A *trxG* tagjainak mutációi a *cis*-regulátorok sektopikus inaktivációját, a *PcG* tagjainak mutációi a *cis*-regulátorok ektopikus aktivációját okozzák.

A *cisz*-regulátor elemek a korai embrióban átíródnak (Sánchez-Herrero és Akam, 1989; Casares és Sánchez-Herrero, 1995; Drewell és mtsai, 2002). Bár a teljes szabályozó régió átíródik, a transzkripció egységei nem határolhatók el teljes mértékben. Átírás mindkét szárlól történik, de a transzkriptumok kódoló vagy szabályozó szerepe nem nyert bizonyítást, bár feltételezett szerepükkel kapcsolatban több elmélet is született (Akbari és mtsai, 2006). Az *iab* régiók transzkripciója nem feltétlenül esik egybe a szegmentek határaival, de kolineáris a *cisz*-regulátorok aktiválódásával.

#### 1.2.1.4 A *cisz*-regulátorok működése

A *bithorax*-komplex egyes génjeinek expressziós szintje az egyes szelvényekben már a korai egyedfejlődés során kialakul. A megfelelő expressziós szint kialakításáért és fenntartásáért a *cisz*-regulátor régiók felelősek (Mihály és mtsai, 2006).

Az iniciáció során a GAP- és PAIR-RULE géntermékek kialakítják a *cisz*-regulátorok aktivitási mintázatát az embrióban. Ekkor alakul ki a *bithorax*-komplex homeotikus génjeinek expressziós mintázata (Casares és Sánchez-Herrero, 1995). Egy adott *cisz*-regulátor az általa szabályozott paraszegment előtt inaktív, az adott szelvényben, illetve az annál hátrébb elhelyezkedő szelvényekben pedig aktív (1.2 ábra). Az így kialakult aktivitási mintázat az egyedfejlődés során fennmarad, sejtosztódásról sejtosztódásra megőrződik.

A *cisz*-regulátorok aktív, illetve inaktív állapotának fenntartását a kromatinszerkezet szintjén ható faktorok biztosítják. Az aktív állapotot az úgynevezett TRITHORAX-csoport tagjai konzerválják, míg az inaktív kromatin konformáció fenntartásáért a POLYCOMB-csoport tagjai felelnek (Kennison, 1995; Pirrotta, 1998).

Az egyes *cisz*-regulátorok működése autonóm; független a többi *cisz*-regulátor működésétől (McCall és mtsai, 1994). A *cisz*-regulátorok képesek az általuk szabályozott homeotikus gének promóterével kapcsolatba lépni, és kialakítani az adott homeotikus gén szelvényt specifikus expressziós szintjét (Sipos és mtsai, 1998). Egy szelvényben mindig csak

egy *cisz*-regulátor lép kapcsolatba az adott homeotikus gén promóterével; a következő szelvényben az újonnan aktiválódó *cisz*-regulátor veszi át a homeotikus gén szabályozásának feladatát. Egyazon homeotikus génhez tartozó *cisz*-regulátorokban található enhanszerek egyre magasabb expressziós szintet biztosítanak az egymást követő szelvényekben. Így például az *Abd-B* gén expressziós szintje a PS10-től a PS15-ig szelvényenként egyre magasabb, és ez a különbség, valamint az egyes homeotikus gének különböző expressziós szintjei következtében kialakuló kifejeződési mintázat okozza ezen potrohszelvények morfológiai különbözőségét (**1.3 ábra**).

A *cisz*-regulátorok működéseinek biztosításához speciális szekvencia részleteket tartalmaznak:

- (1) Az iniciátor elemek a *cisz*-regulátorok korai aktiválódásához, illetve inaktivációjához szükségesek (Mihály és mtsai, 2006). A korai faktorok (GAP, PAIR-RULE fehérjék) kötőhelyeit tartalmazzák megfelelő elrendezésben (Poux és mtsai, 1996).
- (2) A fenntartó elemek (PRE, TRE) azon transz-hatású faktorok (PCG, TRXG) támadáspontjai a DNS-en, melyek felismerik egy adott *cisz*-regulátor aktív, illetve inaktív állapotát, a továbbiakban az egyed teljes élete folyamán fenntartják azt (Simon és mtsai, 1993; Rozovskaia és mtsai, 1999, Mihály és mtsai, 2006).
- (3) A promóter kihorgonyozó régiók felelősek a *cisz*-regulátoroknak az általuk szabályozott homeotikus gének promóteréhez való kapcsolásáért (Sipos és mtsai, 1998; Akbari és mtsai, 2007; Akbari és mtsai, 2008).
- (4) A határoló elemek (izolátorok, boundary régiók) megőrzik a *cisz*-regulátorok autonóm működését azáltal, hogy meggátolják az adott *cisz*-regulátor aktív, illetve inaktív állapotának (kromatin konformációjának) áttérjedését a

szomszédos *cisz*-regulátorokra (Gyurkovics és mtsai, 1990; Hagström és mtsai, 1996; Mihály és mtsai, 1998; Barges és mtsai, 2000; Mihály és mtsai, 2006; Iampietro és mtsai, 2008).

- (5) A *cisz*-regulátorokban található (sejttípus- vagy szövet-specifikus) enhanszerek biztosítják a hozzájuk tartozó homeotikus gén szelvényt-specifikus expressziós szintjét, illetve a homeotikus gének adott sejtre vagy szövetre jellemző expressziós mintázatát. (Simon és mtsai, 1990; Busturia és Bienz, 1993; Pirrotta és mtsai, 1995).

#### 1.2.1.5 A *bithorax*-komplex mutációi

A *bithorax*-komplex génjeinek funkcióvesztéses mutációi az összes olyan szelvényben megnyilvánulnak, melyek identitását az adott homeotikus gén szelvényt-specifikus expressziója alakítja ki.

Az egyes *cisz*-regulátorok aktivitásának elvesztése viszont – szemben az általa szabályozott homeotikus gének funkcióvesztéses fenotípusával – csupán egy szelvény identitását érinti. Ennek az az oka, hogy minden egyes szelvényben egy újabb *cisz*-regulátor aktiválódik. Habár a mutáció által érintett *cisz*-regulátor nem működik az általa szabályozott szelvélynél hátrébb elhelyezkedő szelvényekben sem, a szelvényenként bekapcsolódó újabb és újabb *cisz*-regulátorok képesek biztosítani az adott homeotikus gén szelvényt-specifikus expressziós szintjét.

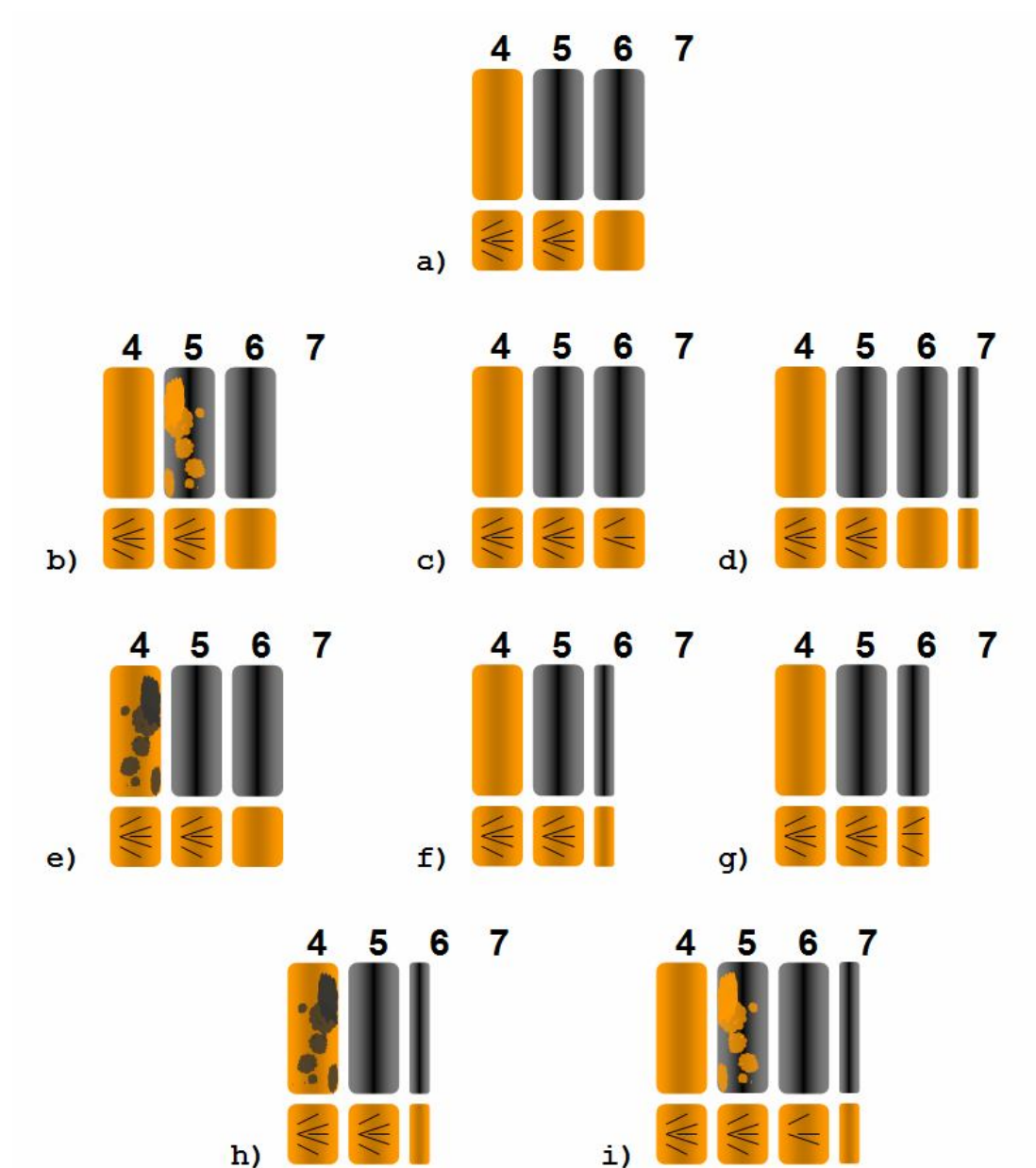
A fent leírtak jól illusztrálhatók a *bithorax*-komplex *Abd-B* génjének, illetve az azt szabályozó *cisz*-regulátorok mutációinak fenotípusával (Lewis, 1985). Azok a legyek, melyek az *Abd-B* gén funkcióvesztéses mutációját heterozigóta formában hordozzák jellegzetes fenotípust mutatnak. Az összes olyan szelvény, melynek identitását az *Abd-B* gén határozza meg (PS10-PS15) az előtte elhelyezkedő szelvényre kezd hasonlítani. Ennek oka az, hogy az *Abd-B* expressziós szintje az egyes szelvényekben az adott szelvényre jellemzőnél



alacsonyabb. Ez az alacsony expressziós szint a szelvényekben olyan génexpressziós viszonyokat alakít ki, ami a vad *ecetmuslica* esetében az adott szelvény előtt elhelyezkedő szelvényre jellemző. Az *Abd-B* mutáns legyek fenotípusa tehát egy *iab-5<sup>-</sup> iab-6<sup>-</sup> iab-7<sup>-</sup> iab-8<sup>-</sup>* mutáns légyre hasonlít.

Az *iab-5<sup>-</sup>* mutációt hordozó legyek ötödik potrohszelvénye a negyedik potrohszelvényre hasonlít: a hímek tergitein világos foltok jelennek meg. Az *iab-6* mutáció a hatodik potrohszelvény identitásának elvesztéséhez vezet. Ez legegyszerűbben a sterniten figyelhető meg, amely a hímek esetében normálisan csupasz. Az *iab-6<sup>-</sup>* mutáns hímeken azonban - az ötödik szelvényhez hasonlóan - a hatodik szelvény sternitjén is szőrök jelennek meg. Az *iab-7* mutáció a hetedik potrohszelvényt teszi a hatodikhoz hasonlatossá, abban az értelemben, hogy a hímeken – melyek hetedik potrohszelvénye vad típusú állatokban nem figyelhető meg - egy csökevényes szelvény megjelenése vehető észre.

Ismertek a *bithorax*-komplexen belül úgynevezett funkciónyeréses mutációk is. Ezen mutációk fenotípusa ellentétes a funkcióvesztéses mutációk által okozott fenotípussal: a *bithorax*-komplex *cisz*-regulátorainak ezen mutációi a szelvények poszterior irányú transzformációját okozzák. A két legismertebb ilyen jellegű mutáció az *Mcp* (Karch és mtsai, 1994; Gruzdeva és mtsai, 2005) és a *Fab-7* (Gyurkovics és mtsai, 1990; Karch és mtsai, 1994). Mindkét mutáció *cisz*-regulátorok közötti határoló szekvenciát érint, melynek következtében az adott szelvényben normálisan inaktív *cisz*-regulátorra is áttérjed a normálisan aktív *cisz*-regulátor kromatinkonformációja.



**1.3 ábra** A *bithorax*-komplex funkciónyerés és funkcióvesztés fenotípusai

Az ábrán hím ecetmuslicák potrohszelvényeinek rajza látható. A számok a szelvények számát jelölik. A felül elhelyezkedő téglalapok a tergiteket, az alatta látható négyzetek a sterniteket szimbolizálják.

**a)** Oregon-R (vad típus) **b)** *iab-5*<sup>-</sup> fenotípus **c)** *iab-6*<sup>-</sup> fenotípus **d)** *iab-7*<sup>-</sup> fenotípus **e)** *Mcp* fenotípus **f)** a heterozigóta *Fab-7*<sup>1</sup> fenotípusa **g)** a heterozigóta *Fab-7*<sup>2</sup> fenotípusa **h)** erős Polycomb fenotípus **i)** erős trithorax fenotípus

## 1.2.2 Az aktív és inaktív kromatinszerkezet szerepe a BX-C regulációjában

### 1.2.2.1 Az aktív és inaktív kromatinkonformáció

Miután a *cisz*-regulátorok aktivitási mintázatát kialakító korai faktorok (a *gap* és *pair-rule* gének termékei) eltűnnek, a POLYCOMB-, illetve TRITHORAX-csoport fehérjéi tartják fenn a kialakult inaktív, illetve aktív állapotot (Kennison, 1995; Pirrotta, 1998). A korai gének termékei tehát valamilyen, általunk egyelőre kevésbé ismert módon megjelölik az aktivált, illetve inaktivált *cisz*-regulátorokat, így jelezve a TRITHORAX-, illetve POLYCOMB-fehérjéknek, hogy hol fejtsék ki a kromatinkonformációt stabilizáló hatásukat.

Az aktív és inaktív kromatinkonformáció közötti különbség megértéséhez először az eukromatin és heterokromatin közötti különbség leírása adott mintát. A PEV (Pozíció Effektus Varietáció) jelenségének leírása közelítette meg először funkcionális szempontból az aktív, illetve inaktív kromatint (Baker, 1968). A PEV jelenségének lényege az, hogy heterokromatikus blokkok közelébe kerülő gének inaktiválódnak (Reuter és Wolff, 1981; Reuter és mtsai, 1982), mert a kondenzált, heterokromatikus szerkezet áttérjed a közeli génre, és megakadályozza a gén transzkripcióját (Wallrath és Elgin, 1995). A PEV által okozott inaktiváció klonális, és nem teljes mértékű (Reuter és mtsai, 1982), ezért azonosíthatók mind a PEV által okozott inaktivációt erősítő (PEV enhanszer), mind azt gyengítő (PEV szuppresszor) mutációk (Reuter és Wolff, 1981).

A POLYCOMB-fehérjék által megvalósított represszió és a PEV közötti hasonlóságot az a megfigyelés sugallta, hogy a HP1 heterokromatikus fehérje, mely génjének mutációja erős PEV szuppresszor, tartalmaz egy domént (kromodomén), mely a POLYCOMB fehérjében is megtalálható (Paro és Hogness, 1991). A hasonlóságot sejteti az a tény is, hogy egyes PCG fehérjék génjeiben, mint például az *E(Pc)* (Sinclair és mtsai, 1998), az *E(z)* (Laible és mtsai, 1997) és a *HDAC1* (Chang és mtsai, 2001) génekben bekövetkező mutációk a PEV szuppresszorai. Ezen megfigyelésekből származik az a modell, amely szerint a POLYCOMB-

gátlás lényege az, hogy POLYCOMB-fehérjék együttműködő komplexe által létrehozott kompakt kromatinszerkezet gátolja az aktiváló hatású faktorok hozzáférését a *cisz*-regulátorokban található kötőhelyeikhez (Paro, 1990; McCall és Bender, 1996; Boivin és Dura, 1998).

Az aktív és inaktív kromatinszerkezet közötti különbség egy új felfogását eredményezte a „hiszton-kód” (Strahl és Allis, 2000; Turner, 2000) jelentőségének felismerése. Az utóbbi évek kutatásai alapján bizonyosnak látszik, hogy egyes fehérjék a hisztonok N-terminális, úgynevezett farki doménjeinek modifikációját felismerve képesek egy adott kromatin szakasz nyitott, vagy zárt konformációját fenntartani. A génaktiváció több esetben hiszton hiperacetilációval és foszforilációval jár együtt, míg a gének inaktivációját gyakran a hisztonok metilációja kíséri a H3 K4, a H3 K9 és a H3 R17 pozíciókban (Li és mtsai, 2002). A DOT1 metiltranszferáz a H3-as hiszton K79 metilációjával járul hozzá az aktív kromatin domének kijelöléséhez (Ng és mtsai, 2002; van Leeuwen és mtsai, 2002). A HP1 heterokromatikus fehérje a K9-es pozícióban metilált H3-as hisztonhoz kötődve kapcsolódik a kromatinhoz (Bannister és mtsai, 2001; Lachner és mtsai, 2001; Jacobs és mtsai, 2001). A BX-C egy darabját tartalmazó transzgenikus konstrukció aktiválása hiperacetilációhoz vezet a beépülés helyén (Cavalli és Paro, 1999). Az aktív, illetve inaktív *cisz*-regulátorokon lévő nukleoszómák eltérő módon módosított hisztonokat tartalmaznak (Papp és Müller, 2006).

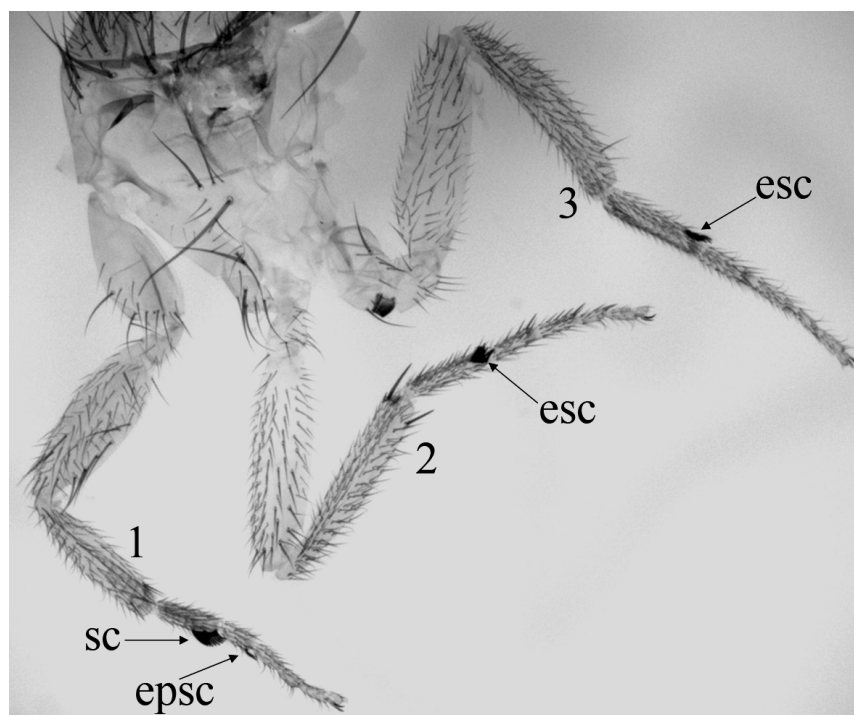
#### **1.2.2.2 A *Polycomb*-csoport**

A *Polycomb*-csoport eddig megismert tagjainak nevét, nevük rövidítését, a gének pozícióját, emlős homológjaikat, valamint fehérjetermékeik funkcióját az **1.1 táblázat** tartalmazza.

<b><i>Drosophila</i> gén</b>	<b>Pozíció</b>	<b>A fehérjetermék doménjei és funkciója</b>	<b>Egér ortológ</b>	<b>Humán ortológ</b>
<i>Additional sex combs</i> { <i>Asx</i> }	51A5-51A6	Zn-finger.	Asxl1 Asxl2 Asxl3	ASXL1 ASXL2/ASXH2 ASXL3
<i>chateau</i> { <i>chm</i> }	27F3-27F4	Zn-finger és winged helix. Hiszton-acetiltranszferáz.	Myst2	MYST2/HBO1/HBOA
<i>corto</i>	82E7-82E7	A PRC1 komplex tagja.	-	-
<i>cramped</i> { <i>crm</i> }	3B3-3B4	SANT-domén, Myb-domén.	Cramp11	CRAMP1L
<i>Drosophila</i> Mi-2 { <i>dMi-2</i> }	76D3-76D4	Kromodomén, Zn-finger, helikáz-domén. A NuRD komplex tagja.	Chd3 Chd4	MI2- $\alpha$ /CHD3 MI2- $\beta$ /CHD4
<i>Drosophila</i> Sfmbl { <i>dSfmbl</i> }	34A7-34A8	MBT domének. A PHORC tagja.	Sfmbl1 Sfmbl2	SFMBT1/SFMBT/RUI SFMBT2
<i>Enhancer of Polycomb</i> { <i>E(Pc)</i> }	47F13-47F14		Epc1 Epc2	EPC1/EPL1 EPC2
<i>Enhancer of zeste</i> { <i>E(z)</i> }	67E5-67E5	SET domén. Hiszton- metiltranszferáz: a H3K27 pozíciót metilálja. A PRC2 komplex tagja.	Ezh1/Enx2 Ezh2/Enx1	EZH1/ENX2 EZH2/ENX1/KMT6
<i>extra sex combs</i> { <i>esc</i> }	33A2-33A2	WD40 repeat. A PRC2 komplex tagjai.	Eed	EED/WAIT-1/HEED
<i>extra sex combs like</i> { <i>escl</i> }	33B5-33B5			
<i>grainy head</i> { <i>grh</i> }	54F1-54F1	Dimer formájában köti a DNS-t.	-	-
<i>lethal (3) malignant brain tumor</i> { <i>l(3)mbt</i> }	97F1-97F1	SAM, MBT, Zn-finger.	L3mbtl L3mbtl2/M4 mbt L3mbtl3 ?	L3MBTL L3MBTL2/h-l(3)mbt L3MBTL3/MBT-1 L3MBTL4
<i>multi sex combs</i> { <i>mxc</i> }	8D2-8D2	RNS-kötő domén.	Larp7	-
<i>pipsqueak</i> { <i>psq</i> }	47A13-47B1	BTB, (HX) <sub>n</sub> , psq motívum. DNS kötő fehérje.	-	-
<i>pleiohomeotic</i> { <i>pho</i> }	102F8-102F8	Zn-finger. A PHORC tagja.	mYY1/YY1	hYY-1/NF-E1/DELTA/ UCRBP/INO80S
<i>pleiohomeotic like</i> { <i>phol</i> }	67B7-67B8	Zn-finger.	YY1	YY2
<i>Polycomb</i> (Pc)	78C6-78C7	Kromodomén fehérje, amely a H3K27 pozícióban trimetilált hisztont ismeri fel. A PRC1 komplex tagja.	M33/Cbx2 Mpc2/Cbx4 Cbx6 Cbx7 Pc3/Cbx8	HPC1/CBX2/M33/HPC HPC2/CBX4 CBX6 CBX7 HPC3/CBX8/RC1
<i>Polycomblike</i> (Pcl)	55B8-55B8	Zn-finger domén. Hiszton- deacetiláz, a PRC2 komplex tagja	Mtf2 Phf19 Phf1	M96/MTF2/PCL2 PCL3/PHF19 PHF1
<i>polyhomeotic</i> { <i>ph</i> }	2D2-2D2 2D2-2D3	SAM and Zn-finger fehérjék, a PRC1 komplex tagjai	Phc1 Phc2 Phc3	HPH1/RAE28/PHC1/EDR1 HPH2/PHC2/EDR2 HPH3/PHC3/EDR3
<i>polyhomeotic distal</i> { <i>ph-d</i> }				
<i>polyhomeotic proximal</i> { <i>ph-p</i> }				
<i>Posterior sex combs</i> (Psc)	49E6-49E6	Zn-finger, RING-domén. PRC1 komplex tagja.	Bmi-1 Pcgf2 Pcgf6 Pcgf1 Pcgf3 Pcgf5	BMI-1/RNF51/PCGF4 Mel-18/RNF110/PCGF2 RNF134/PCGF6/MBLR NSPC1/PCGF1/RNF68 RNF3/PCGF3/ DONG1/ RNF3A RNF159/PCGF5/
<i>Rpd3</i>	64B12-64B12	A PRC2 komplex tagja, hiszton- deacetiláz	Hdac1 Hdac2 Hdac3 Hdac8	HDAC1/HD1/GON-10/RPD3L1 HDAC2/RPD3/YAF1 HDAC3/HD3/RPD3-2 HDAC8/HDACL1
<i>Sex comb on midleg</i> { <i>Scm</i> }	85E2-85E2	SAM domén, Zn-finger. A PRC1 komplex tagja.	Scmh1 Scml1 Scml2	SCMH1/SCML3 SCML1 SCML2
<i>Sex combs extra</i> { <i>Sce</i> } / <i>dRING</i>	98B1-98B1	Zn-finger, RING-domén. A PRC1 komplex tagja.	RING1a RING1b	RING/RING1/RNF1/RING1A RING1B/RING2/BAP- 1/BAP1/DING/HIP3/RNF2
<i>super sex combs</i> { <i>sxc</i> }	41C1-41C2	-	-	-
<i>Suppressor of zeste 2</i> { <i>Su(z)2</i> }	49E7-49E7	Zn-finger	-	Su(Z)2/SUZ2
<i>Suppressor of zeste 2 distal</i> { <i>Su(z)2D</i> }				
<i>Suppressor of zeste 12</i> { <i>Su(z)12</i> }	76D4-76D4	Zn-finger. A PRC2 nukleoszóma kötéséhez szükséges	Suz12	SUZ12/JJAZ1/CHET9

### 1.1 táblázat A *Polycomb*-csoport ismert tagjai

A *Polycomb*-csoport nevét egy jellegzetes fenotípusról kapta (extra sex comb, esc), mely egyes *PcG* gének mutációira, illetve azok interakciójára jellemző, és az ANT-C hibás regulációjának következménye (**1.4 ábra**). A fenotípus lényege, hogy a normálisan csak a hímek első lábán megfigyelhető szex fésű megjelenik a második, illetve a harmadik lábon is.



**1.4 ábra** Jellegzetes Polycomb-fenotípusok (extra sex comb és epi-sex comb)

A számok az egyes torsiáknak tartozó lábakat jelölik. A további jelölések: sc – sex comb (szex fésű; a normális helyén), esc – extra sex comb (a második, illetve harmadik lábon), epsc – epi-sex comb (a szexfésű megjelenése a normálistól eltérő lábszeli részekben). (Az ábrán látható preparátum egy *Pis<sup>110</sup>/Pis<sup>103</sup>* (*Pis*: *Piros szem*) genotípusú állatból készült. Mindkét mutációt laborunkban izolálták.)

Egyes *Polycomb*-csoportba tartozó gének funkcióvesztéses mutációi a *bithorax*-komplex funkciónyeréses mutációihoz hasonló homeotikus transzformációt okoznak (**1.3 ábra**). Ennek az az oka, hogy a POLYCOMB-géntermékek csökkent mennyisége esetén a *cis*-

regulátorok az egyedfejlődés során elvesztik az inaktív konformációjukat (ektopikusan aktiválódnak) azokban a szelvényekben is, amelyekben a szegmetációs gének termékeinek hatására inaktív állapotba kerültek (Denell és Frederick, 1983).

Vannak olyan *Polycomb*-gének is, amelyek mutációi nem eredményeznek önálló fenotípust, de a represszor komplex más, már korábban ismert tagjainak mutációival domináns genetikai kölcsönhatást mutatnak (Jürgens, 1985; Cheng és mtsai, 1994; Campbell és mtsai, 1995; Kehle és mtsai, 1998).

A POLYCOMB-fehérjék a sejtmagban lokalizálódnak és a fejlődő embrióban egyenletesen oszlanak el (Dietzel és mtsai, 1999). A POLYCOMB-fehérjék represszáló multimer komplexeket hoznak létre (Kingston és mtsai, 1996; Strutt és Paro, 1997; Shao és mtsai, 1999). Ezt támogatja az a megfigyelés is, hogy ha különböző POLYCOMB-fehérjék elleni ellenanyagokkal megfestjük a lárva óriáskromoszómáit, gyakran azonos sávok jelölődnek ki (Rastelli és mtsai, 1993). A PC, PCL és PH kötőhelyek teljesen átfednek, de a PSC és a HDAC1 helyekkel is gyakran átfedést mutatnak (Zink és Paro, 1989; DeCamillis és mtsai, 1992; Franke és mtsai, 1992; Martin és Adler, 1993; Rastelli és mtsai, 1993; Lonie és mtsai, 1994; Chang és mtsai, 2001). Az E(Z) és ESC kötőhelyek teljesen átfednek egymással (Carrington és Jones, 1996; Tie és mtsai, 1998), és gyakran egyeznek a PC, PCL, PH, SCM, ASX és E(PC) kötőhelyekkel is (Peterson és mtsai, 1997; Sinclair és mtsai, 1998; Stankunas és mtsai, 1998).

Számos esetben direkt fehérje-fehérje kölcsönhatásokat is kimutattak a *Polycomb*-csoport géntermékei között (Kyba és Brock, 1998; Tie és mtsai, 1998). Immunoprecipitációval POLYCOMB-komplexeket izolálni is lehet (Kingston és mtsai, 1996; Shao és mtsai, 1999; Klymenko és mtsai 2006). A POLYCOMB-fehérjék kötődése gátolja más faktorok hozzáférését egy adott DNS szakaszhoz (Boivin és Dura, 1998).

A POLYCOMB-komplexek támadáspontja a DNS-en az egyes *cisz*-regulátorokban található silencer elem, az úgynevezett Polycomb Response Element (PRE) (Simon és mtsai, 1993). Az egyes PRE szakaszokon kialakuló komplexek összetételükben különböznek, sőt, az egyes komplexek sztöchiometriája sem szigorúan meghatározott (Kingston és mtsai, 1996; Shao és mtsai, 1999; Klymenko és mtsai 2006). Több POLYCOMB-komplex biokémiai tisztítása is sikerrel járt. A PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1) tagjai a PC, PH, PSC és SCM fehérjék (Kingston és mtsai, 1996; Shao és mtsai, 1999; Saurin és mtsai, 2001), a PRC2 komplex pedig az ESC, E(Z) és PCL fehérjéket tartalmazza (Ng és mtsai, 2000; Tie és mtsai, 2001; O'Connel és mtsai, 2001). Mint később kiderült, két különböző összetételű PRC2 komplex is létezik; ezek közül csupán az egyik tartalmazza a PCL fehérjét (PCL-PRC2). A PRC1 kromatinhoz való kötődését elősegíti a H3 hiszton K27 pozíciójának metilációja, mely a PCL-PCR2 és PRC2 komplexek működésének eredménye (Nekrasov és mtsai, 2007). A PCL-PRC2 komplexet nem csak embrióból, hanem lárvából is sikerült izolálni (Savla és mtsai, 2008). Ezeken kívül izoláltak még olyan POLYCOMB-komplexeket (PHORC; PHO Repressive Complex) is, melyeket a PHO fehérje horgonyoz a PRE szakaszokhoz (Klymenko és mtsai, 2006).

Az egyes POLYCOMB-fehérjék bizonyos mértékig egymást helyettesíthetik. Erre utal például az is, hogy a *ph* haplo-insufficiens fenotípusa menekíthető egy másik *PcG* gén – a *Pcl* – kópiaszámának emelésével (Cheng és mtsai, 1994).

Még bonyolultabbá teszi a képet az, hogy a POLYCOMB-fehérjék közül sokan saját génjük és más *Polycomb*-gének transzkripcióis represszorai. A *ph* maga is bizonyítottan a PCG által szabályozott (Fauvarque és Dura, 1993). A *Polycomb*-gének szabályozásában nem csak POLYCOMB-, de TRITHORAX-fehérjék is részt vehetnek (Bloyer és mtsai, 2003).

Nagyméretű delécióknak egyes *Polycomb*-csoportba tartozó gének mutációival adott genetikai interakciói alapján a POLYCOMB-csoport tagjainak számát negyvenre becsülték



(Jürgens, 1985). Eddig csak néhány olyan PCG fehérje ismert, mely közvetlenül köti a DNS-t. Ilyen a PHO (Brown és mtsai, 1998), a PHOL (Brown és mtsai, 2003), illetve a PSQ (Huang és mtsai, 2002). Egy negyedik fehérje - a GRH - a PHO fehérjével lép kölcsönhatásba, kooperatív módon hozzájárulva egy DNS-kötő komplex létrehozásához (Blastyák és mtsai, 2006). A GAGA-faktorról (Farkas és mtsai, 1994) és a ZESTE-ről (Saurin és mtsai, 2001) is feltételezik, hogy szerepet játszanak a PC-komplexek DNS-hez kötésében (Horard és mtsai, 2000). Egy régebbi felfogás szerint a GAGA-faktor működése megelőzi a PC-komplexek DNS-hez való kötődését. A GAGA-faktor a NURF komplexszel együttműködve képes nukleáz-hiperszenzitív régiók létrehozására (Tsukiyama és Wu, 1995; Peterson, 1996), ami előfeltétele lehet a PC-komplexek PRE szakaszokhoz való asszociációjának (Hagström és mtsai, 1997).

A POLYCOMB-fehérjék erősen konzerváltak, homológjaikat egérben, emberben, *Caenorhabditis*-ben és *Arabidopsis*-ban is megtalálták (Müller és mtsai, 1995; Faust és mtsai, 1998; Tomotsune és mtsai, 1999; Akasaka és mtsai, 2001; Goodrich és mtsai, 1997; Yoshida és mtsai, 2001). Funkciójuk is konzervált, a *Drosophila* POLYCOMB egér homológja menekíti a *Drosophila* mutáns fenotípusát (Müller és mtsai, 1995), és ugyanez igaz a PHO emlős homológjára, a YY1-ra is (Atchison és mtsai, 2003).

Bizonyos emlős PCG homológok onkogénként viselkednek a vérképző sejtekben: mutációjuk a sejtosztódás és az epigenetikus determináció zavaraihoz vezet (Gould, 1997; Schumacher és Magnuson, 1997; van Lohuizen, 1998 és 1999, Valk-Lingbeek és mtsai, 2004; Martinez és Cavalli, 2006).

### 1.2.2.3 A PRE és a POLYCOMB-gátlás kapcsolata

Az eddig jellemzett PRE-k néhány száz bázispár hosszúságú DNS szakaszok. Változatos szerkezetük ellenére legtöbbjük tartalmaz egy konzervált szekvencia elemet, amely a PHO fehérje kötőhelyének felel meg (Mihály és mtsai, 1997). A PRE-kat általában több, egymással kölcsönhatásban álló DNS szakasz építi fel, melyek csak együtt képesek

PRE-ként funkcionálni (Poux és mtsai, 1996; Blastyák és mtsai, 2006). Az elsődleges fontosságú szakaszok represszor hatását kiegészítő PRE szakaszok stabilizálhatják.

A POLYCOMB-fehérjék PRE-hoz való kötődését sikerült X-ChIP (X-linked Chromatin Immunoprecipitation) módszerrel is kimutatni (Orlando és mtsai, 1998). Több modell is született annak magyarázatára, hogy a PRE szakaszon kötődő POLYCOMB-fehérjék hogyan képesek egy több kilobázis hosszúságú *cisz*-regulátoron inaktív konformációt kialakítani.

A legrégebbi modell szerint a POLYCOMB-csoport fehérjei egyszerűen becsomagolják a kromatint, ezáltal a kromatin olyan, heterokromatin-szerű állapotát hozzák létre, mely az aktiváló hatású faktorok számára hozzáférhetetlen (Paro, 1990; Messmer és mtsai, 1992; Reuter és Spierer, 1992).

A „looping or enhancer interference” modell szerint kiterjedt DNS szakaszok becsomagolódása nélkül, egyszerűen az enhanszer-promóter interakciók gátlásával is elképzelhető a POLYCOMB-fehérjekomplexek által kifejtett represszálo hatás (Pirrotta és Rastelli, 1994; Bienz és Müller, 1995; Simon, 1995).

A „hop and skip” modell az előző modell továbbfejlesztése, mely szerint fő és mellék PRE szakaszokon szerveződő komplexek asszociációja építi fel az enhanszerek és promóterek kapcsolatát gátló szerkezeteket (Sigrist és Pirrotta, 1997; Pirrotta, 1998).

Az előzőektől eltérő felfogást tükröz a kompartmentalizációs modell, mely azt a lehetőséget veti fel, hogy a POLYCOMB-komplexek fő feladata az inaktíválendő célszekvenciák inaktív nukleáris kompartmenthez való horgonyzása (Felsenfeld, 1996; Strouboulis és Wolffe, 1996).

A DMI-2 jelű POLYCOMB-fehérje génjének klónozása vetette fel a hiszton-deacetilációs modell hipotézisét (Kehle és mtsai, 1998). A DMI-2 fehérjét tartalmazó NURD komplex képes a H3 és H4 hisztonok N-terminális farki doménjének deacetilálására, illetve ATP-függő nukleosóma átépítő képességgel is rendelkezik (Zhang és mtsai, 1998). Az elvégzett

kísérletek alapján kialakított modell szerint az aktív *cisz*-regulátorok hiperacetiláltak, míg az inaktívak hipoacetiláltak. A *HDAC1* deacetiláz génjének mutációja Pc enhanszer fenotípust mutat, a HDAC1 fehérje pedig képes a Pc fehérje kötésére (Chang és mtsai, 2001).

A legújabb kísérletek eredményei szerint a PCG fehérjék mind az aktív, mind az inaktív kromatin doménben jelen vannak, és a PRE szakaszokhoz horgonyzódnak. Speciális faktorok (pl. az ASH1 [ABSENT, SMALL OR HOMEOTIC DISCS 1]) jelenléte szükséges ahhoz, hogy a domén aktívvá váljon, és ebben a folyamatban nagyon fontos szerepük van a hisztonok egyes módosításainak is. A PRE szakaszokon felépülő komplexek távoli elemekkel létesíthetnek kapcsolatot (Papp és Müller, 2006).

#### 1.2.2.4 A *trithorax*-csoport és a TRE

A *trithorax*-csoport klasszikus genetikai, illetve molekuláris módszerekkel azonosított tagjait az **1.2 táblázat** mutatja be.

A *trithorax*-csoportba tartozó gének közül sokat az alapján azonosítottak, hogy funkcióvesztéses mutációik szuppresszálják a *Polycomb*-gének funkcióvesztésének köszönhető funkciónyeréses (gain-of-function) homeotikus fenotípust.

A TRITHORAX-fehérjék felelősek az adott szelvényben bekapcsolódó *cisz*-regulátorok aktív kromatinkonformációjának fenntartásáért. Ennek megfelelően, funkcióvesztéses (loss-of-function) mutációik olyan homeotikus transzformációt okoznak, mint a *bithorax*-komplex funkcióvesztéses mutációi (**1.3 ábra**).

<i>Drosophila</i> gén	Pozíció	A fehérjetermék doménjei és funkciója	Egér ortológ	Humán ortológ
<i>absent, small or homeotic discs 1 {ash1}</i>	76B8-76B9	Zn-finger, SET-domén. Kölcsönhat a dCBP fehérjével, és aktiválja a génkifejeződést.	Ash11	ASH1L/ASH1/huASH1/ASH1L1/KMT2H
<i>absent, small or homeotic discs 2 {ash2}</i>	96A13-96A13	Zn-finger.	Ash21	ASH2L/ASH2L2/ASH2/BRE2
<i>brahma {brm}</i>	72C1-72C1	A SWI/SNF complex ATPáz alegysége. Bromodomén tartalmaz, amivel acetilált hisztont köt. Kölcsönhat a Bap55 és Bap60 fehérjékkel.	Smarca1 Smarca2 Smarca4 Chd11	SMARCA1/SNF2LB/NURF140/ISWI/SWI/SNF2L1/SNF2L SMARCA2/hBRM/SNF2L2/BAF190/hSNF2a/Sth1p/SNF2LA/B RM/SNF2/ SWI2 SMARCA4/SNF2L4/hSNF2b/B RG1/BAF190/SNF2/SWI2/SNF 2-β/SNF2LB CHD1L/ALC1
<i>breathless {btl}; devenir {dev}</i>	70D2-70D2	Tirozin protein kináz domén.	Fgfr2 Fgfr3	FGFR-2 FGFR-3
<i>Distal-less {Dll}; Brista {Ba}</i>	60E2-60E2	Homeodomén-szerű domén. Transzkripciós factor.	Dlx1 Dlx2	DLX-2
<i>domino {dom}</i>	57D11-57D12	SANT, helikáz-domén. DNS-függő ATPáz	Srcap	SRCAP/EAF1/SWR1/DOMO1
<i>female sterile (1) homeotic {fs(1)h}</i>	7D3-7D5	Bromodomén.	Brd4 Brd2 Brd3 Brdt	BRD4/HUNKI/MCAP/CAP/HU NK1 BRD2/RING3/NAT/FSRG1 BRD3/RING3L BRDT/BRD6
<i>homothorax {hth}</i>	86C1-86C3	Homeodomén. DNS kötő fehérje.	Meis2	Meis2
<i>Imitation SWI {Iswi}</i>	49B10-49B10	SANT-domén. ATP-függő DNS-transzlokáz. A NURF komplex és az ACF komplex tagja.	Smarca5	SMARCA5/hSNF2H/hISWI/ISWI
<i>kismet {kis}</i>	21B4-21B5	ATP-függő helikáz, kromodomén tartalmaz.	Chd6 Chd7 Chd8 Chd9	CHD6 CHD7 CHD8/HELSNF1/DUPLIN CHD9
<i>kohtalo {kto}</i>	76D1-76D1	Transzkripciós koaktivátor.	Med12 Med12l	MED12/TNRC11/CAGH45/HO PA/OPA1/TRAP230 MED12L/TNRC11L/TRALPUS H/TRALP
<i>little imaginal discs {lid}</i>	26B2-26B2	Zn-finger, AT-gazdag régió. H3K4-demetiláz.	Jarid1a Jarid1b Jarid1c Jarid1d	JARID1A/RBBP2 JARID1B/PLU- 1/RBBP2H1A/KDM5B JARID1C/SMCX JARID1D/SMCY
<i>lola like {lola}</i>	55B9-55B9	BTB domén. Az RNS-polimeráz II transzkripciós faktora.	-	-
<i>modifier of mdg4 {mod(mdg4)}</i>	93D7-93D9	Zn-finger, BTB domén.	-	-
<i>moira {mor}</i>	89A8-89A11	SANT, DNS-kötő domén.	Smarcc1 Smarcc2	SMARCC1/BAF155/SRG3/CR ACC1 SMARCC2/BAF170/CRACC2
<i>nejire {nej}</i>	8F7-8F9	Zn-finger, bromodomén. Transzkripciós koaktivátor.	Ep300	EP300/p300/KAT3B
<i>osa/eyelid</i>	90C1-90C2	AT-gazdag régió, armadillo-típusú domén. DNS-kötő fehérje. A Brahma-komplex tagja.	Arid1a Arid1b	ARID1A/C1orf4/SMARCF1/B1 20/P270/C10orf4/ BAF250/BAF250a ARID1B/"ELD/OSA1"/p250R/ BAF250b/DAN15/6A3-5

<b>Drosophila gén</b>	<b>Pozíció</b>	<b>A fehérjetermék doménjei és funkciója</b>	<b>Egér ortológ</b>	<b>Humán ortológ</b>
<i>sallimus</i> { <i>sls</i> }	62C2-62C4	Immunglobulin, fibronectin homológia.	-	-
<i>skuld</i> { <i>skd</i> }	78A2-78A2	Transzkripció koaktivátor.	Med13 Med13l	MED13/TRAP240/THRAP1 MED13L/TRAP240L/THRAP2
<i>Snf5-related 1</i> { <i>Snr1</i> }	83A4-83A4	A SWI/SNF complex szerkezeti alegysége.	Smrbc1	hSNF5/INI1/BAF47/SMARCB1
<i>Suppressor of Polycomb at 37D</i> { <i>Su(Pc)37D</i> }	37D2-37D5	-	-	-
<i>taranis</i> { <i>tara</i> }	89B8-89B9	Transzkripciót fenntartó funkció.	-	-
<i>trithorax</i> { <i>trx</i> }	88B1-88B1	Zn-finger, SET domén.	MLL1 MLL2 MLL3 MLL5	MLL1/ALL-1/HRX/TRX1/HTRX1/CXXC7/ MLL1A/KMT2A MLL2/MLL4/ALR/CAGL114/T NRC21 MLL3/HALR/KMT2C MLL5/KMT2E
<i>Trithorax-like</i> { <i>Trl</i> }	70F4-70F4	Zn-finger, BTB. A NURF komplex partnere.	-	GAGA factor
<i>trithorax-related</i> { <i>trr</i> }	2B14-2B14	SET, Zn-finger.	-	-
<i>urdur</i> { <i>urd</i> }	87F12-87F15	-	-	-
<i>Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase 55kD B subunit</i> { <i>Vha55</i> }; <i>lethal a in 87C</i> { <i>l(3)87Ca</i> }	87C2-87C3	Hidrogén-ion transzportáló ATPáz.	Atp6v1b2	V-type proton ATPase subunit B
<i>verthandi</i> { <i>vtd</i> }; <i>Rad21</i>	80F-80F	Rad21/Rec8 szerű fehérje.	Rad21	hHR21
<i>zeste</i> { <i>z</i> }	3A3-3A3	Homeodomén-szerű domén.	-	-

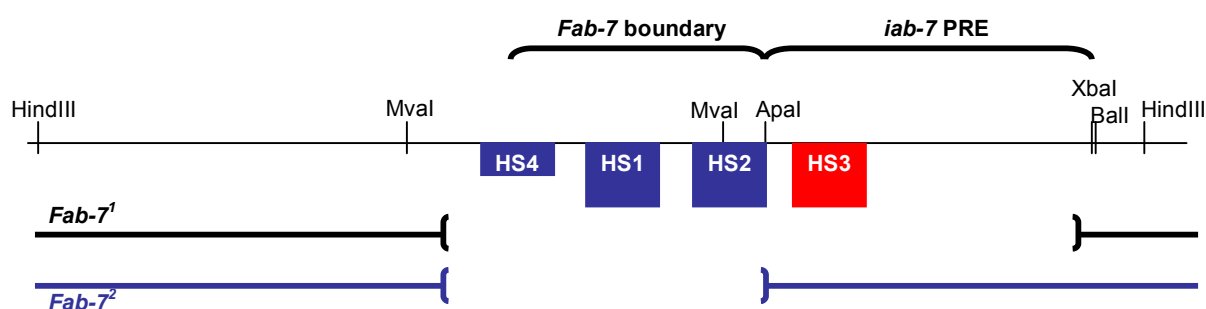
## 1.2 táblázat A trithorax-csoport ismert tagjai

A TRITHORAX-csoport nagyon heterogén. Egyes tagjainak közvetlen szerepe van az aktív kromatinkonformáció fenntartásában, például nukleosómák elmozdításáért felelős fehérjekomplexek (SWI/SNF, NURF) részeként. A *brm* (Tamkun, 1995), a *mor* (Crosby és mtsai, 1999), az *Snr1* (Dingwall és mtsai, 1995) és az *osa* (Collins és mtsai, 1999) gének termékei a SWI/SNF (BRAHMA) komplex tagjai, a *Trl* és az *Iswi* gének termékei pedig a NURF komplex működésében játszanak szerepet (Tsukiyama és mtsai, 1995). Egyes TRITHORAX-fehérjéknek – például az *fs(1)h* gén termékének - kináz aktivitásuk van (Digan és mtsai, 1986). A *lid* gén terméke a H3 hiszton K4 demetiláza (Lee és mtsai, 2007; Eissenberg és mtsai, 2007). Mások fizikai interakcióba lépnek a TRX fehérjével és PRE szakaszokkal szomszédos TRE szekvenciákhoz kötődnek; például az ASH1, ami a H3 hiszton K4, K9 és a

H4 hiszton K20 pozícióját metilálja (Beisel és mtsai, 2002). Némelyikük egyszerűen a homeotikus gének transzkripció faktorai; például a KIS a TRX és az ASH1 fehérjéket a kromatinhoz irányítva segíti az RNS POLIMERÁZ II korai elongációját. (Srinivasan és mtsai, 2008; Papp és Müller 2006).

#### 1.2.2.5 A *Fab-7* régió: boundary és PRE

A *Fab-7* régió a BX-C *iab-6* és *iab-7* *cisz*-regulátorai között elhelyezkedő határoló szekvencia (Gyurkovics és mtsai, 1990; Hagström és mtsai, 1996). Működéséhez elengedhetetlen három nagyobb nukleáz-hiperszenzitív DNS szakasz jelenléte (1.5 ábra). A régió két fő részre tagolható. Egyik részét néhány kisebb és két nagyobb (HS1 és HS2) nukleáz-hiperszenzitív szakasz alkotja. Ez a rész az izolátor (boundary), amely elszigeteli az *iab-6* és az *iab-7* *cisz*-regulátor elemeket. Ez az izolátor szakasz transzgenikus konstrukciókban képes megakadályozni az egyik oldalán lévő enhanszer és a másik oldalán lévő promoter kölcsönhatását: úgynevezett enhanszer-blokként viselkedik (Hagström és mtsai, 1996).



**1.5 ábra** A *Fab-7-iab-7* PRE régió felépítése

A HS-el jelölt négyzetek a nukleáz-hiperszenzitív helyeket jelölik. Az ábrán a *Fab-7*<sup>1</sup> típusú deléciót fekete, míg a *Fab-7*<sup>2</sup> típusú deléciót kék vonal jelzi.

A *Fab-7* régió másik részét a hármas számú nukleáz-hiperszenzitív szakasz (HS3) adja, mely tulajdonképpen a POLYCOMB-fehérjék kötődését biztosító silencer, az *iab-7* PRE (Hagström és mtsai, 1996; Mihály és mtsai, 1997). Az *iab-7* PRE feladata az *iab-7* cisz-regulátor inaktív állapotának fenntartása a hetedik potrohszelvény előtt elhelyezkedő szelvényekben.

A *Fab-7* régiót érintő deléciók két csoportba sorolhatók. A *Fab-7<sup>1</sup>* deléció eltávolítja mind az izolátor, mind az *iab-7* PRE funkciót (**1.5 ábra**). A mutáció által okozott fenotípus funkciónyeréses, hiszen a hatodik potrohszelvényben aktívvá váló *iab-6* kromatinkonformációja akadály nélkül áttérjedhet az *iab-7* cisz-regulátor elemre. Azok a deléciók, melyek az izolátor szakaszt eltávolítják, de az *iab-7* PRE szakaszt érintetlenül hagyják (*Fab-7<sup>2</sup>*; **1.5 ábra**) sajátos, kettős fenotípust eredményeznek. A hatodik potrohszelvény egyes sejtjeiben az aktív *iab-6* cisz-regulátor kromatinkonformációja terjed át az *iab-7* szakaszra (funkciónyerés), míg más sejtekben az *iab-7* inaktív konformációja terjed át az *iab-6* régióra (funkcióvesztés). Az *iab-7* cisz-regulátor egyes sejtekben való ektopikus aktivációját a hatodik potrohszelvény csökkent mérete jelzi (a hatodik potrohszelvény a hetedikre hasonlít). Ugyanakkor a hatodik sterniten megjelenő szőrök arra utalnak, hogy bizonyos sejtekben csak az *iab-5* cisz-regulátor szakasz aktív, az *iab-6* nem (a hatodik potrohszelvény az ötödikre hasonlít).

A *Fab-7-iab-7* PRE régióhoz hasonló működésű az *iab-4* és *iab-5* között elhelyezkedő *Mcp* (*Miscadastral pigmentation*) régió (Gruzdeva és mtsai, 2005), valamint az *iab-7* és *iab-8* között található *Fab-8* (*Frontabdominal-8*) régió (Barges és mtsai, 2000).

#### 1.2.2.6 A *Fab-7<sup>2</sup>* mutáció *Polycomb*- és *trithorax*-génnek mutációinak hátterében

A *Fab-7<sup>2</sup>* mutáció következtében kialakuló *iab-6-iab-7* kettős domén szerkezete különösen érzékeny a POLYCOMB- illetve a TRITHORAX-csoportba tartozó fehérjék mennyiségére. A klasszikus *Polycomb*-mutációk *Fab-7<sup>2</sup>* enhanszerek, vagyis erősítik a *Fab-*

7<sup>2</sup> mutáció funkciónyeréses jellegét. Ennek az az oka, hogy egy POLYCOMB-fehérje mennyiségének csökkenésével gyengül az *iab-7* PRE szakaszon kialakuló represszió (a kettős domén kromatinszerkezete nagyobb valószínűséggel lesz aktív, mint inaktív). Ezzel ellentétben a *trithorax*-jellegű mutációk a Fab-7<sup>2</sup> fenotípus szuppresszorai, mert növelik a valószínűségét annak, hogy az *iab-6-iab-7* kettős doménben az inaktív kromatinkonformáció stabilizálódjon.

### 1.2.3 Transzreguláció és transzvekción

#### 1.2.3.1 A transzvekción fogalma

Az *ecetmuslica* nyálmirigy óriáskromoszómáinak kromoszómapárjai interfázisban fizikailag szorosan párosodott állapotban figyelhetők meg. Mint kiderült, ez az interfázisos kromoszómapárosodás a többi sejtre is jellemző. A párosodott állapotnak funkcionális jelentősége van. Egyes gének esetében kimutatták, hogy a *cisz*-regulátorok transz-regulációra is képesek. Ha a homológ kromoszómák párosodását átrendeződések megakadályozzák, akkor a *transz*-reguláció nem jön létre. Amennyiben ez fenotípusos következményekkel jár, akkor transzvekciónról beszélünk (Lewis, 1954; Pirrotta, 1990; Duncan 2002).

Több gén esetében megfigyelhető, hogy a gén enhanszerének mutációja komplementálja a transzkripciós egység mutációját. Ennek oka a transzreguláció: az ép enhanszer képes a homológ kromoszómán lévő ép struktúrgén promóterével kapcsolatba lépni (Sipos és mtsai, 1998).

A transzvekción másik formája a párosodás érzékeny gátlás (pairing-sensitive silencing). Ez a forma jellemző a PRE szakaszok működésére (Kassis, 1994; Hagström és mtsai, 1997). A PRE-k csak akkor viselkednek silencer-ként, ha más PRE-jellegű szakasszal, vagy szakaszokkal kölcsönhatásba tudnak lépni. Ez lehetséges egy adott kromoszómán belül – ha a PRE-k nem túlságosan távol helyezkednek el egymástól –, vagy homológ kromoszómák között, amikor a PRE a homológon lévő párjával lép kapcsolatba. Egyes PRE



szakaszt tartalmazó transzgenikus konstrukciókban csak akkor represszálódik a riportergén, ha a transzgén homozigóta formában van jelen.

### 1.2.3.2 A *Fab-7<sup>l</sup>* mutáció *Polycomb*- és *trithorax*-gének mutációinak hátterében

Az *iab-7* *cisz*-regulátor inaktív kromatinkonformációja a hatodik potrohszelvényben párosodás-érzékeny. Az inaktív konformáció úgy alakul ki, hogy különböző POLYCOMB-fehérjék multimer represszor komplexet alkotnak úgy, hogy a komplex mindkét homológ PRE szekvenciájához kötődik (Mihály és mtsai, 1997).

A heterozigóta *Fab-7<sup>l</sup>* mutációt a heterozigóta funkcióvesztéses *trithorax*-mutációk szuppresszálják, hasonló okokból, mint a *Fab-7<sup>2</sup>* mutációt. Ami meglepőbb: számos heterozigóta *Polycomb*-mutáció enhanszere a *Fab-7<sup>l</sup>* fenotípusának, pedig a *Fab-7<sup>l</sup>* jellegű delécia kiejti a PRE szakaszt is. Ha a PRE szekvencia deléciójával az *iab-7* PRE gátlása teljesen megszűnne, akkor a *Fab-7<sup>l</sup>* érzéketlen volna a POLYCOMB-fehérjék mennyiségére. Az, hogy a heterozigóta *Polycomb*-mutációk egy része a *Fab-7<sup>l</sup>* mutációnak is enhanszere, egyrészt arra enged következtetni, hogy az *iab-7* PRE hozzájárul a *transz* helyzetű *iab-7* *cisz*-regulátor inaktív állapotának stabilizálásához, ha valamely PCG fehérje mennyisége lecsökken, másrészt bizonyítja, hogy a POLYCOMB-fehérjék nem csupán az *iab-7* PRE szakaszhoz kötnek, hanem számos más, az *iab-7* *cisz*-regulátoron belül lévő, eddig nem ismert PRE-jellegű szakaszhoz is.

Az eddigi kísérleti eredmények alátámasztják azt az elképzelést, amely szerint a POLYCOMB-fehérjekomplex úgy fejt ki inaktíváló hatását, hogy bizonyos POLYCOMB-fehérjék kötődnek a PRE szakaszokhoz, és az így kialakult DNS-fehérje komplex kölcsönhatásba lép a szomszédos, másodlagos PRE-kkal. Ez a kooperatív jellegű kölcsönhatás stabil, az egész *cisz*-regulátorra kiterjedő inaktíváló komplexet eredményez. Ezekben a kölcsönhatásokban mind *cisz*-, mind pedig *transz*-jellegű kapcsolatok szerepet játszanak. Ennek megfelelően

elképzeltető, hogy vannak olyan POLYCOMB-fehérjék is, amelyek csak az egyes PRE-k közötti kölcsönhatások kialakításában játszanak szerepet.

### 1.2.3.3 Transzvekción vizsgálata PRE-transzgénekkel

A PRE-t tartalmazó transzgenikus konstrukciók embrióba injektálva hajlamosak endogén PRE-k szomszédságába beépülni („homing”: Fauverque és Dura, 1993; Kassis, 1994; Chan és mtsai, 1994; Bender és Hudson, 2000). A transzgenikus konstrukcióba épített PRE szakaszok az inszerción helyén ektopikus POLYCOMB-kötőhelyet hoznak létre az óriáskromoszómán (Zink és mtsai, 1991; Chan és mtsai, 1994; Chiang és mtsai, 1995; Zink és Paro, 1995) és képesek fenntartani a riportergén represszióját (Simon és mtsai 1993, Chan és mtsai, 1994). A represszió azonban csak akkor jön létre, ha a transzgenikus konstrukció nem tartalmaz korai enhanszereket. Ez a represszió általában párosodás-függő, és érzékeny a POLYCOMB-csoportba tartozó fehérjék mennyiségére (Fauvarque és Dura, 1993; Chan és mtsai, 1994; Ginhard és Kaufman, 1995; Hagström és mtsai, 1997).

Ha olyan transzgén konstrukcióval transzformálunk embriókat, melyben egy riportergén és enhanszere között PRE szekvencia található, a homozigóta lárvákban és a kifejlett egyedekben is alacsonyabb a riportergén kifejeződése, mint a heterozigótákban. Ez a párosodás-érzékeny gátlás jelensége (Kassis, 1994; Hagström és mtsai, 1997).

Hagström és munkatársai számos olyan transzformáns vonalat hoztak létre, melyek genomjukban különböző pozíciókban hordozzák a *white enhancer::iab-7 PRE::miniwhite* transzgén konstrukciót. A kifejlett egyedekben a *miniwhite* – riportergént tartalmazó konstrukció kiváló eszköz a párosodás-érzékeny gátlás vizsgálatára. A transzgénre nézve homozigóta állatok szemszíne azért világosabb, mint a heterozigótáké, mert a PRE szakaszokon kötő POLYCOMB-fehérjék párosodás-érzékeny módon gátolják a *miniwhite* expresszióját. Ha a párosodás megszűnik (például kromoszóma átrendeződések hatására), a szemszín sötétédeése figyelhető meg.

#### 1.2.3.4 PRE-transzgének viselkedése a fenntartó rendszer mutációinak hátterében

*Polycomb*-mutációk hátterében – a transzgenikus konstrukción kialakult párosodás-érzékeny gátlás gyengülése miatt – a *miniwhite* riportergén expressziója emelkedik: a szemszín sötétebb, mint a mutációt nem hordozó állatok szemszíne. Amennyiben egy *Polycomb*-mutáció a transzgenikus szemszínre nem sötétíti, annak a következő okai lehetnek:

- (1) Az adott mutáció által meghatározott fehérje nem tagja az *iab-7* PRE szakaszon felépülő represszor komplexnek.
- (2) Az adott mutáció által meghatározott fehérje féldózisa elegendő a teljes gátlás megvalósulásához.
- (3) Az adott mutáció lecsökkenti az aktív fehérje mennyiségét, de ez a fehérje önszabályozásának köszönhetően az ép kópia repressziójának gyengülését okozza, így a fehérje expressziós szintje nem változik detektálható mértékben.
- (4) Az adott mutáció lecsökkenti az aktív fehérje mennyiségét, ennek következtében azonban az adott fehérje által represszált más POLYCOMB-fehérjék expressziója megnő. Ezek a fehérjék esetlegesen helyettesíthetik a mutáns fehérjét a PRE szakaszon kialakult represszor-komplexben.

A TRITHORAX-jellegű fehérjék mutációi általában világosítják a transzgénre nézve homozigóta legyek szemszínét, mivel csökkentik a *miniwhite* riportergén expresszióját. Ennek oka valószínűleg abban keresendő, hogy a leírt transzgének a PRE-n kívül hordozhatnak a TRXG fehérjék számára hozzáférhető DNS szakaszokat (TRE: Trithorax Response Element) is. Egyes *trithorax*-mutációk nem hatnak az ilyen konstrukciót hordozó állatok szemszínére, sőt, némely mutációk sötétítik a szemszínre.

Nem hatnak a *trithorax*-csoport génjeinek mutációi a szemszínre abban az esetben, ha:

- (1) Az adott mutáció által meghatározott fehérje nem tagja a konstrukción kialakuló komplexnek.

- (2) Az adott mutáció által meghatározott fehérje tagja a komplexnek, de a mutáció következtében egyes PCG fehérjék expressziós szintje lecsökken, az így okozott represszió gyengülés kompenzálja az aktiváció gyengülését.

Egyes *trithorax*-csoportba tartozó gének mutációi sötétítik a transzgenikus konstrukciót homozigóta formában hordozó egyedek szemszínét. Ennek két fő oka lehet:

- (1) Az adott mutáció által kijelölt TRXG fehérje nem vesz részt a PRE szakaszon kialakuló komplex felépítésében, viszont szerepe van valamely olyan POLYCOMB-fehérje transzkripciós regulációjában, mely represszor hatást fejt ki az adott PRE-n. Ezért a TRXG fehérje szintjének csökkenését csak az általa szabályozott POLYCOMB-fehérje csökkenéseként érzékeljük.
- (2) A mutáció által kijelölt fehérje szükséges a POLYCOMB-komplex kialakulásához. Ilyen pl. a GAGA-faktort kódoló *Trl* gén (Farkas és mtsai, 1994) mutációja (az *iab-7* PRE esetében). A *Trl* mutáció szemszínsötétítő hatásának valószínűleg az az oka, hogy a POLYCOMB-komplexek PRE szakaszokhoz való kötődésének feltétele a PRE szakasz nyílt kromatinkonformációja (DNáz hiperszenzitív helyek kialakulása), mely a GAGA-faktor közreműködését igényli (Hagström és mtsai, 1997) **(1.2.2.2 fejezet)**. Ezzel összhangban van az a megfigyelés, hogy az *iab-7* PRE, valamint az *Mcp* PRE több GAGA kötőhelyet is tartalmaz (Mishra és mtsai, 2001; Busturia és mtsai, 2001).

#### 1.2.4 A POLYCOMB-gátlás eddig ismeretlen tulajdonságai

A POLYCOMB-fehérjék működésével kapcsolatban számos olyan kérdés merül fel, melyre az eddig alkalmazott genetikai módszerekkel nem lehet választ adni.

Az egyik ilyen kérdés az, hogy hagyományos genetikai módszerekkel miért sikerült csupán 15 *Polycomb*-csoportba tartozó gént azonosítani, holott a *Polycomb*-csoport génjeinek

számát kb. 40-re becsülték (Jürgens, 1985). Ennek oka valószínűleg a korábbi mutáns-izolálási módszerekben keresendő, ugyanis azokkal a *Polycomb*- és a *trithorax*-csoport géneinek csak olyan mutációit lehetett izolálni, amelyek domináns homeotikus fenotípust okoztak, vagy domináns *Polycomb*-szuppresszorok voltak. Szükség volt tehát új elgondolásokon alapuló, nagyobb érzékenységű mutáns-izolálási módszerek kifejlesztésére.

Kérdések merültek fel azzal kapcsolatban is, hogy milyen összetételű egy adott PRE szakaszon felépülő POLYCOMB-komplex, melyek a fontos és kevésbé fontos elemei, illetve milyen mértékben állandó és meghatározott a komplexek összetétele. Nem ismertek pontosan az *iab-7* PRE szerkezeti elemei sem.

Ezen kérdések genetikai úton való megválaszolásához segítséget nyújthat olyan transzgenikus konstrukciók alkalmazása, melyek egy riporter gén (*miniwhite*) mellett egy izolált PRE szakaszt is hordoznak. Ilyen vonalak segítségével megállapíthatjuk, hogy az eddig ismert, *Polycomb*- illetve *trithorax*-csoportba tartozó gének termékei közül melyek hatnak az adott PRE szakaszon, illetve izolálhatjuk az eddig ismeretlen gének mutációit. A különböző PRE szakaszokat tartalmazó transzgenikus konstrukciók segítségével megállapíthatjuk az egyes POLYCOMB-, illetve TRITHORAX-fehérjék PRE-specifitását is.

A transzgenikus konstrukciókkal végzett genetikai kísérletek esetlegesen segíthetnek az általunk vizsgált PRE szakasz közelében, vagy azzal átfedve elhelyezkedő TRE szakaszok feltérképezésében is.

## 2 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 2.1 *Drosophila* tenyészet és törzsek

A *Drosophila* törzsek fenntartásához standard *Drosophila* médiumot használtunk, melynek főbb összetevői: kukoricaliszt, szárított élesztő, agar, cukor. A táptalaj penészesedését 0,53 % propionsav és 0,053 % foszforsav hozzáadása gátolja. Azokban a kísérletekben, ahol az n-butírárt hatását vizsgáltuk, a propionsavat és a foszforsavat 0,15 % Tegosept M-mel helyettesítettük (melyet 10 % térfogat-százalékos 96 %-os alkoholos törzsoldatból mértünk ki). A megadott koncentrációjú n-butírárt (Merck) 2 M koncentrációjú 6,8-as pH-jú vizes oldatból mértük bele a médiumba, miután annak hőmérséklete 57 °C alá csökkent (Reuter és mtsai, 1982).

Kísérleteinket általában 25 °C-on *en masse* végeztük, az ettől való eltérést az adott kísérlet leírásánál külön jelezzük.

A keresztezésekhez használt törzsek leírását az **Anyagok és módszerek** fejezet megfelelő része, illetve Lindsley és Zimm 1992-es munkája tartalmazza, valamint kikereshetőek a <http://flybase.org> weboldalon.

### 2.2 A 18.73.1 és a 102.103.2 transzgén

A *w; 18.73.1* és a *w; 102.103.2* törzs Paul Schedl laboratóriumából származik. Mindkét vonal a második kromoszómába inszertált *white enhancer::iab-7 PRE::miniwhite* felépítésű transzgenikus konstrukciót hordoz.

A *18.73.1* transzgénre nézve heterozigóta állatok szemszíne piros, a transzgént homozigóta formában hordozó legyek variegáló, világos narancssárga szemszínűek (**3.2 ábra**). Hagström és munkatársainak 1997-es publikációja szerint a szemszínt a  $Pc^{106}$ , a  $Sce^I$ , a

$Su(z)^{302}$ , a  $brm^2$ , a  $kto^1$  mutációk nem befolyásolják, a  $trx^{E2}$  mutáció világosítja, a heterozigóta  $Trl^{13C}$  mutáció pedig sötétíti.

A 102.103.2 jelű konstrukció egy rövid, úgynevezett minimál PRE szakaszt hordoz. A heterozigóta állatok szemszíne piros, a homozigótáké narancssárga, elszórt piros ocellumokkal (3.3 ábra).

A 18.73.1 jelű, és más, *iab-7* PRE-transzgén hordozó törzseket Kirsten Hagström, az *Mcp* PRE-transzgén hordozó törzseket pedig Martin Müller bocsátotta rendelkezésünkre.

## 2.3 Általános módszerek

### 2.3.1 EMS mutagenézis

Egy napnál nem idősebb, a 18.73.1 transzgén *white* háttéren hordozó hímeket fél napig éhezettünk, majd 0,025 M etil-metán-szulfonátot (EMS) tartalmazó 1%-os cukoroldattal etettünk öt órán át. A kezelés után a hímeket w/w ; 18.73.1/18.73.1 szűz nőstényekhez kereszteztük.

### 2.3.2 Komplementációs analízis

A komplementációs analízishez felhasznált *trxG* és *PcG* allélok és deléciók a következők voltak: *mor<sup>1</sup>*, *skd<sup>2</sup>*, *urd<sup>2</sup>*, *brm<sup>2</sup>*, *vtd<sup>2</sup>*, *dev<sup>1</sup>*, *osa<sup>2</sup>*, *sam<sup>1</sup>*, *kto<sup>1</sup>*, *Df(3L)kto2*, *ash1*, *ash2*, *Df(3R)red trx*, *R85(Trl<sup>13C</sup>)*, *Df(2L)PMF /kismet/*, *Su(Pc)37D* ; *Pcl<sup>R5</sup>*, *Asx<sup>D1</sup>*, *Psc<sup>1</sup>*, *sxc<sup>1</sup>*, *Df(2R)vg<sup>B</sup> /Psc*, *Su(z)2*, *Su(z)2D/*, *vg<sup>C</sup> /Iswi/*, *Pc<sup>3</sup>*, *Pc<sup>106</sup>*, *Scm<sup>D1</sup>*, *Scm<sup>E47C1</sup>*, *Sce<sup>1</sup>*, *Su(z)5*, *Df(3L)E(z)<sup>IR3</sup>*, *ccf<sup>025</sup>*, *dMi2*, *grh<sup>B37</sup>*, *Su(z)12<sup>3</sup>*. Az *R85(Trl<sup>13C</sup>)* (Farkas és mtsai, 1994) mutációt laborunkban állították elő. A komplementációs keresztezésekhez felhasználtunk még más, laborunk által izolált allélokat is. A legtöbb mutáció leírását Lindsley és Zimm 1992-es munkája tartalmazza.

A komplementációs keresztezések értékelésénél egy komplementációs csoportba soroltuk azokat a mutációkat, melyek transzheterozigóta állapotban az állat elpusztulását okozták. Ezeket a mutációkat egyazon gén alléljainak tekintettük.

### 2.3.3 Röntgen reverziós kísérletek

A funkciónyeréses allélok reverziójára röntgensugárzást alkalmaztunk. A besugárzást a SzOTE Onkoterápiás Klinikáján végeztük, 4000 r (1000 r / perc) dózissal. A besugarazott hímek  $w/Y; 18.73.1/18.73.1$  ;  $GOF/TM3$  illetve  $w/Y; 18.73.1/18.73.1$  ;  $GOF/GOF$  genotípusúak voltak, ahol  $GOF$  (gain-of-function) általánosan az általunk izolált funkciónyeréses mutációt jelöli. A mutagenizált hímeket  $w/w; 18.73.1/18.73.1$  ;  $TM3/TM6$  szűz nőstényekhez kereszteztük.

### 2.3.4 Röntgen-indukált mutagenézis

A röntgensugárzással végrehajtott mutagenézis funkcióvesztéses mutációk izolálására szolgált. A besugárzást a SzOTE Onkoterápiás Klinikáján végeztük, 4000 r (1000 r / perc) dózissal. A besugarazott hímek  $w/Y; 102.103.2/102.103.2$  genotípusúak voltak. A mutagenizált hímeket  $w/w; 102.103.2/102.103.2$  szűz nőstényekhez kereszteztük.

### 2.3.5 A kromoszóma-preparátumok készítése

A harmadik kromoszómás mutáns ( $w/Y; transzgén/transzgén; Mutáció/Balanszer [ebony]$ ) hímeket  $ebony/ebony$  szüzekhez kereszteztük. Az  $ebony$  homozigóta mutáns formában a lárva elülső trachea-spirákulumainak megsötétedését okozza. Az  $ebony$  fenotípust nem mutató lárvákból készítettük a preparátumot, mert ezek a vizsgálandó mutációt hordozzák egy átrendeződést nem mutató kromoszómával szemben ( $Mutáció/ebony$ ).

A második kromoszómás mutáns hímeket ( $w/Y; transzgén Mutáció/y^+CyO$ ) a  $Bc$  (*Black cells*)/ $SM5$  törzsből származó szűz nőstényekhez kereszteztük, majd ebből a keresztezésből  $Bc/transzgén Mutáció$  genotípusú hímeket gyűjtöttünk, és ezeket *Oregon-R* (+/+) szüzekhez kereszteztük. A  $Bc$  domináns mutáció lárvális markerként használható, a



mutációt hordozó lárvák teste fekete foltos. A preparátumokat a Bc fenotípust nem mutató (*transzgén Mutáció/+*) genotípusú lárvákból készítettük.

A vizsgálathoz harmadik stádiumos lárvákra van szükség. A lárvából egy csepp 45 %-os ecetsavban szilikonizált tárgylemezen kiboncoltuk a nyálmirigyeket, melyek ez idő alatt rögzítődnek is. A nyálmirigyeket 2 %-os orceint tartalmazó egy-egy arányú tejsav-ecetsav oldatban 15-20 percig festettük.

A festés után 60 %-os tejsavas-ecetsavas oldattal lemostuk a nyálmirigyeket, majd szilikonizált tárgylemezen egy csepp tiszta tejsavas-ecetsavba helyeztük őket. Fedőlemezzel lefedtük a preparátumokat, szűrőpapírral eltávolítottuk a felesleges folyadékot, és hüvelykujjal, egyetlen erőteljes nyomással szétnyomtuk a nyálmirigyeket. Az elkészült preparátumokat légmentesen lefedtük és fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgáltuk.

### 2.3.6 P-elem mobilizálása funkcióvesztéses *bonus* allélok előállítása céljából

$w/w$ ;  $bon^{249/12}/TM3$  szüz nőstényeket  $w^+/Y$ ;  $Df(3R)C7ry^{506}/TM3$   $Sb$   $ry^{RK}$   $\Delta 2-3$   $ry^+$  hímekhez kereszteztünk. A keresztezésből származó első utódgenerációból a  $w/Y$ ;  $bon^{249/12}/TM3$   $Sb$   $ry^{RK}$   $\Delta 2-3$   $ry^+$  jumpstarter hímeket egyenként  $w/w$ ;  $TM3/TM6$  szüzekhez kereszteztük, és olyan, csak a  $TM6$  balanszert hordozó hím utódokat kerestünk, melyekben nem expresszálódik a P-elem jelenlétére utaló *miniwhite* riportergén, vagyis a szemük színe fehér. Egy *jumpstarter* hím utódai közül csak egy fehér szemű hímeket kereszteztük tovább. Az így kiválogatott fehér szemű hímeket  $bon^{R13-117A}/TM3$  szüz nőstényekhez kereszteztük. Azokból a fiolákból, ahol a balanszert nem hordozó, transzheterozigóta állatok nem jelentek meg (vagyis az excízió letalitást mutatott a  $bon^{R13-117A}$  alléllal szemben) a  $TM3$ -as balanszert hordozó hímekből és nőstényekből törzset állítottunk be.

### 2.3.7 A *RUCU* térképező kromoszóma előállítása

A *RUCU* kromoszómát a *rucuca* térképező-kromoszómából állítottuk elő rekombináció segítségével. A *RUCU* a *rucuca* kromoszóma markereit tartalmazza a *scarlet*

(*st*) és a *claret* (*ca*) markerek kivételével. A kromoszómát azért állítottuk elő, mert szeretnénk volna a mutagenézis kísérleteinkből származó mutációkat a PRE-tartalmú konstrukcióra való hatásuk alapján térképezni. Ezt a *rucuca* kromoszóma nem teszi lehetővé, mert a *st* és a *ca* mutációk világosítják a transzgenikus konstrukciók által kialakított szemszínt.

### 2.3.8 Meiotikus térképezés

A *10A/2*, *21* és *24* jelű mutáció térképezéséhez a *w/w*; *18.73.1/18.73.1*; *Mutáció/TM3* szüzeket kereszteztünk *w/w*; *18.73.1/18.73.1*; *RUCU/RUCU* hímekhez. A *RUCU* kromoszóma a *roughoid* (*ru*) (61F8-61F8), *hairy* (*h*) (66D10-66D10), *thread* (*th*) (72C1-72D5), *curled* (*cu*) (86D3-86D4), *stripe* (*sr*) (90E4-90F1) és *ebony* (*e*) (93C7-93D1) recesszív markereket tartalmazza. A keresztezésből *w/w*; *18.73.1/18.73.1*; *RUCU/Mutáció* szüzeket gyűjtöttünk és *w/w*; *18.73.1/18.73.1*; *RUCU/RUCU* hímekhez kereszteztük vissza. A sötét szemű hím utódokon (amelyek hordozzák a térképezendő mutációt) recesszív markerek jelenlétét vizsgáltuk. A domináns sötét szemszínen kívül a *21* jelű mutáció esetében kihasználtuk a mutáció által okozott domináns *iab-5<sup>-</sup>* fenotípust, a *10A/2* jelű mutáció esetében pedig a domináns humerális szőrhány fenotípust is.

A *Fes* mutációt domináns *Fab-7<sup>2</sup>* szuppresszor hatása alapján térképeztük. Mivel a térképezéshez felhasználni kívánt kromoszómán a szemszínre ható recesszív markerek is találhatóak, ahhoz, hogy a második kromoszómás markereket a térképezéshez használni tudjuk, a *Fes<sup>120(V)2</sup>* mutációt hordozó kromoszómáról rekombinációval eltávolítottuk a *18.73.1* transzgenikus konstrukciót. A konstrukciótól megszabadított *w/Y*; *Fes<sup>120(V)2</sup>/y<sup>+</sup>CyO* genotípusú hímeket *w<sup>+</sup>/w<sup>+</sup>*; *al...sp/Cy* szűz nőstényekhez kereszteztük. Az *al...sp* kromoszóma az *aristaless* (*al*) (21C1-21C1), *dumpy* (*dp*) (24F4-25A1), *black* (*b*) (34D1-34D1), *purple* (*pr*) (38B3-38B3), *curved* (*c*) (52D3-52D7), *plexus* (*px*) (58E4-58E8) és *speck* (*sp*) (60C1-60C2) recesszív markereket tartalmazza. A keresztezésből a *w<sup>-</sup>/w<sup>+</sup>*; *Fes<sup>120(V)2</sup>/al...sp* szüzeket gyűjtöttük és *w<sup>+</sup>/Y*; *al...Bl...sp/Cy* hímekhez kereszteztük. A

*al...Bl...sp* kromoszóma az *al...sp* kromoszóma markerein kívül tartalmazza a *Bristle (Bl)* domináns markert is. A fenti keresztezésből származó hím utódok közül olyanokat válogattunk ki, melyek az *al...Bl...sp* kromoszóma felett az *al...sp* kromoszóma markerei közül csak egyet, kettőt, hármat, stb. tartalmaztak, és a fehértől eltérő szemszínnel rendelkeztek. A kiválogatott hímeket egyesével  $w^+/w^+$ ; *P14.1#2 (Fab-7)/P14.1#2 (Fab-7)* szűz nőtényekhez kereszteztük. Az egyes fiolákban a keresztezésből származó, *Bl* markert hordozó és azt nem hordozó hímeket hasonlítottuk össze. Amennyiben a *Bl* markert nem hordozó hímek *Fab-7* fenotípusa gyengébb volt a *Bl* markert hordozó hímekénél, akkor feltételeztük, hogy a rekombináns kromoszóma hordozza a  $Fes^{120(V)2}$  mutációt, mely szuppresszálja a *Fab-7<sup>2</sup>* fenotípust.

## 2.4 Molekuláris genetikai módszerek

### 2.4.1 Kompetens sejtek készítése

A kompetens sejtek készítéséhez XLI-Blue *Escherichia coli* törzset használtunk fel. Az indító kultúrát Tetracyclin tartalmú (12.5 µg/ml) LB médiumban (Bacto-triptone 10 g/l, Bacto-yeast extract 5 g/l, NaCl 10 g/l, pH=7,5 autoklávozással sterilizett) növesztettük fel egy éjszakán keresztül. Az indító kultúrából 0,5 ml-t használtunk fel egy 200 ml-es kultúra indításához. A kompetens sejteket 18 °C-on 36 óráig növesztettük SOB médiumban antibiotikum nélkül (Bacto- tryptone 20 g/l, Bacto-yeast extract 5 g/l, NaCl 10 mM, MgCl 10 mM pH=6,8 autoklávozással sterilizett, felhasználás előtt 10 mM sterilre szűrt MgSO<sub>4</sub>-gyel kiegészített). A kultúra növekedését denzitásméréssel (600 nm) ellenőriztük. Amikor a baktériumkultúra denzitása elérte az OD<sub>600</sub>=0,6 értéket, a kultúrát 10 percre jégre tettük, majd 50 ml-es steril Falcon csövekbe szétosztva 2000 rpm-mel 10 percig centrifugáltuk +4 °C-ra előhűtött centrifugában. A laza pelletről eltávolítottuk az összes felülúszót, majd csövenként 15 ml jéghideg transzformációs pufferben (TB: 10 mM PIPES pH=6,7 1 M-os KOH-dal, csak

a helyes pH értéknél oldódik fel a PIPES, 55 mM  $\text{MnCl}_2$  15 mM  $\text{CaCl}_2$  250 mM KCl) teljesen felszuszpendáltuk a sejteket. Ezután 10 percig jégen tartottuk a csöveket, majd újabb 2000rpm-es 10 perces centrifugálás következett a  $+4\text{ }^\circ\text{C}$ -ra előhűtött centrifugában. A felülúszót eltávolítottuk, majd a pelletet 2,5 ml jéghideg TB-ben szuszpendáltuk fel. 175  $\mu\text{l}$  DMSO hozzáadása után az elegyet jól összekevertük, majd 10 percig jégen tartottuk. A sejteket 100  $\mu\text{l}$ -es aliquotokban szétmértük steril eppendorf csövekbe, melyeket azonnal folyékony nitrogénben lefagyasztottunk és  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltunk.

#### **2.4.2 Kompetens sejtek transzformálása**

A transzformálandó DNS-t 200  $\mu\text{l}$  XLI-Blue kompetens sejthez adtuk, majd az elegyet 30 percen keresztül inkubáltuk jégen. Ezután  $42\text{ }^\circ\text{C}$ -os termosztátban 90 másodpercig hősokkoltuk a sejteket. Ezután az elegyet 3-5 percig jégen, majd 800  $\mu\text{l}$  LB médium hozzáadása után 45 percen keresztül  $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk. Ezek után a sejteket szilárd táptalajra szélesztettük.

#### **2.4.3 Plazmid miniprep készítése forralásos módszerrel**

2-2,5 ml antibiotikumot tartalmazó LB médiumba (Bacto-triptone 10 g/l, Bacto-yeast extract 5 g/l, NaCl 10 g/l, pH=7,5 autoklávozással sterilizett) leoltottuk a plazmidot tartalmazó baktériumot, majd  $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on növesztjük egy éjszakán keresztül. Az indító kultúrát Eppendorf csőbe töltöttük és 13000 rpm-en centrifugáltuk egy percen keresztül. A csapadékot 300  $\mu\text{l}$  STET pufferben (0,1 M NaCl, 10 mM Tris-Cl (pH=8), 1 mM EDTA (pH=8), 5 % TRITON X-100) vettük vissza, 15  $\mu\text{l}$  lizozimot adtunk hozzá, és 10 másodpercig vortexeltük. Ezután forrásban lévő vízbe tettük 60-90 másodpercre, majd 40  $\mu\text{l}$  5 M ammónium-acetátot mértünk hozzá, és 13000 rpm-en centrifugáltuk 20 percen keresztül. A csapadékot fogpiszkálóval eltávolítottuk, hozzáadtunk 420  $\mu\text{l}$  hideg izopropanolt és összevortexeltük. Ezután 5 percre  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ -ra tettük, majd 10 percen keresztül 13000 rpm-el centrifugáltuk. A

felülúszót leöntöttük és a csapadékot 70 %-os etanollal mostuk, majd szárítottuk. A DNS-t desztillált vízben vettük vissza.

#### **2.4.4 A plazmid miniprep tisztítása**

50 µl DNS oldathoz 300 µl LiCl-ot (4N) adtunk, és jégen tartottuk 30 percen át. Ezután 10 percen keresztül 12000 rpm-el centrifugáltuk, majd a felülúszóhoz 600 µl izopropanolt adtunk, és 30 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az inkubáció után az oldatot 10 percen keresztül 12000 rpm-el centrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük és a csapadékra 1 ml 70%-os etanolt mértünk, majd 5 percen keresztül 12000 rpm-el centrifugáltuk. A csapadékot szárítottuk és desztillált vízben visszavettük.

#### **2.4.5 Transzgenikus konstrukciók klónozása**

##### **2.4.5.1 A pBluescript-FRTs vektor létrehozása**

Az FRT szakaszokat egyes szálú oligonukleotidok formájában vásároltuk a Microsynth cégtől. Az egyes szálú oligonukleotidok hibridizációjával állítottuk elő a klónozható kettős szálú FRT szekvenciákat. Az FRT szekvencián kívül az oligonukleotidokba hasítóhelyeket is terveztünk, amelyek a további klónozási lépéseket segítették elő. A baloldali FRT oligo a szélein NotI és XbaI helyeket hordoz, a jobboldali részén, az FRT szekvenciától jobbra pedig egy ApaI hasítóhely található benne. A jobboldali FRT oligo a szélein HindIII és KpnI helyeket hordoz, valamint az FRT szekvenciától balra egy Ball hasítóhely található benne. Az FRT szekvenciák a hibridizáció után a következők voltak (az ApaI, illetve Ball hasítóhelyeket aláhúzással jelöltük):

Bal FRT oligo 1: 5'-ggc cgc gaa gtt cct att ctc tag aaa gaa tag gaa ctt ctg ggg gcc ct - 3'

Bal FRT oligo 2: 5'-cta gag ggc ccc cag aag ttc cta ttc ttt cta gag aat agg aac ttc gc - 3'

Jobb FRT oligo 1: 5'-agc ttt ggc cag gga agt tcc tat tct cta gaa aga ata gga act tct ggg tac-3'

Jobb FRT oligo 2: 5'- cc aga agt tcc tat tct ttc tag aga ata gga act tcc ctg gcc aa - 3'

### 2.4.5.2 A *Fab-7* HindIII-HindIII fragmentből származó kisebb fragmentek

#### szubklónozása

- (1) A *Fab-7* régióból származó MvaI-HindIII fragmentet (~1200 bp) egy *Fab-7* HindIII-HindIII fragmentet tartalmazó pBluescript KS II + vektorból kiindulva több szubklónozási lépés után *blunt end* klónoztuk pBluescript KS II + vektor EcoRV hasítóhelyére.
- (2) Az (1) lépésben előállított plazmidból kiindulva EcoRI és HindIII enzimekkel kivágtuk a *Fab-7* fragmentumot, majd az első lépésben előállított pBluescript-FRTs vektorba klónoztuk.
- (3) Az FRT oligonukleotidokba tervezett hasítóhelyek segítségével, fragmentizálás nélkül, egyponthozott ligálással előállítottuk a *Fab-7* régió kisebb fragmentumait (ApaI-HindIII illetve MvaI-Ball) FRT-k közé klónozva hordozó plazmidokat.
- (4) A legkisebb konstrukciót (FRT-*Fab-7* ApaI-Ball-FRT) az ApaI emésztéssel előállított konstrukcióból Ball enzimmel történő emésztés, illetve az ezt követő önligálás segítségével állítottuk elő.
- (5) Az előállított négy konstrukciót (FRT-*Fab-7* MvaI-HindIII-FRT, FRT-*Fab-7* ApaI-HindIII-FRT, FRT-*Fab-7* MvaI-Ball-FRT, FRT-*Fab-7* ApaI-Ball-FRT) átklónoztuk a *Drosophila* embrió transzformálására alkalmas CaSpeR 4 klónozó vektorba.

### 2.4.6 *In situ* hibridizáció lárvális nyálmirigy óriáskromoszómán

A nyálmirigy-preparátumot tartalmazó tárgylemezeket 30 percen keresztül 65 °C-os vízfürdőben, 2xSSC oldatban inkubáltuk. Ezután 10-10 percig 75 %-os, majd további 10 percig 95 %-os etanol oldatban inkubáltuk a lemezeket, miközben az alkohol oldat hőmérséklete 65 °C-ról szobahőmérsékletre csökkent. Ezután 2 percig 70 mM NaOH-dal

denaturáltuk a kromoszómális DNS-t, majd háromszor 5 percig mostuk a lemezeket 2xSSC oldatban. Ezek után kétszer 5 percig 70 %-os, majd egyszer 5 percig 95 %-os etanol oldatban dehidratáltuk a lemezeket, majd megszáritottuk őket.

A DIG-jelölt próba elkészítéséhez a Boehringer-protokolt alkalmaztuk, a végtérfogat 20  $\mu$ l volt (0,1-0,5  $\mu$ g linearizált DNS fragment /a *white* gén egy szakasza/). A hibridizációs keverék összetétele a következő volt: 40 % formamid, 5 % SSC, 0,1 % SDS, 20 mM  $\text{NaPO}_4$  (pH=7,00), DNS-próba (0,1-0,5  $\mu$ l), UP  $\text{H}_2\text{O}$ . A DIG-jelölt DNS-t 10 percig vízben főztük, majd jégben lehűtöttük és hozzáadtuk a többi összetevőt is. Egy preparátumra 10  $\mu$ l elegyet használtunk. A preparátumot 20x30 mm-es szilikonizált fedőlemezzel fedtük. A preparátumokat 37 °C-on inkubáltuk egy éjszakán át 2xSSC oldatot tartalmazó nedves kamrában.

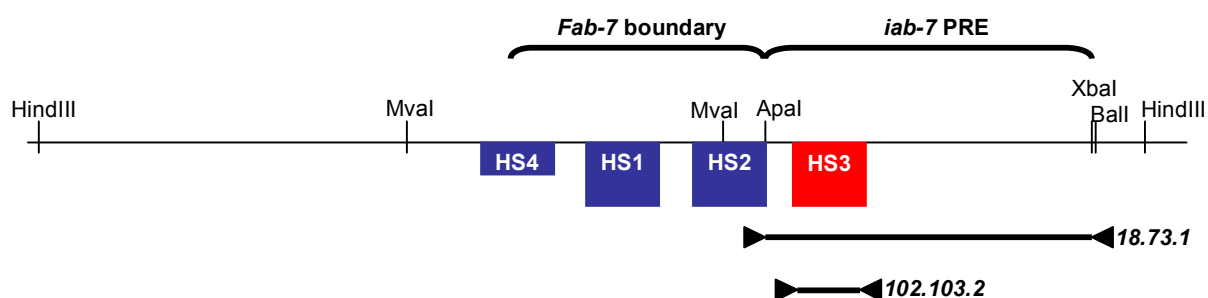
A színreakció kiváltásához a lemezeket először kétszer 3 percig az I. pufferben (100 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl pH=7,5) mostuk, majd 30 percig a II. pufferben (I. puffer + 0,5 % blokkoló reagens, 65 °C-on feloldva) inkubáltuk. Ezután a lemezeket ismét az I. pufferben mostuk kétszer 5 percen át. A DIG-Ab-Ap konjugátumot 1:1000 arányban az I. pufferben hígítottuk, majd a 50-50  $\mu$ l-t a lemezekre pipettáztunk, és a lemezeket fedőlemezzel fedtük. Egy óra szobahőmérsékleten való inkubáció után kétszer 15 percig az I. pufferrel, majd kétszer 15 percig a III. pufferrel (100 mM TRIS-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM  $\text{MgCl}_2$  pH=9,5) mostuk a lemezeket. Ezután jégen és sötétben tartva 1 órán át inkubáltuk a lemezeket a színreagenssel (4,5  $\mu$ l NBT, 3,5  $\mu$ l BCIP /X-phosh/). A reakciót úgy állítottuk meg, hogy a lemezeket háromszor 15 percig mostuk a IV. pufferrel (10 mM TRIS, 1 mM EDTA pH=8). Az óriáskromoszómákat ezek után orceinnel festettük.

### 3 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

#### 3.1 Mutánsizolálási kísérletek leírása

Mutagenézis kísérleteink elsődleges célja az volt, hogy egy izolált PRE szakaszt (az *iab-7* PRE-t), illetve annak környezetét tartalmazó transzgenikus konstrukciók segítségével azonosítsuk azokat a faktorokat, melyek ezen a DNS szakaszon fejtik ki hatásukat. Azt reméltük, hogy a *Polycomb*-, illetve a *trithorax*-csoport eddig ismeretlen tagjainak azonosítása mellett mutagenézis kísérleteink segítségével információt nyerhetünk az *iab-7* PRE szakaszon felépülő fehérjekomplex működéséről is.

Mutánsizolálási kísérleteinkben két különböző transzgenikus konstrukciót használtunk. A *18.73.1* jelű konstrukció a *Fab-7-iab-7* PRE régió *Apal*-*XbaI* szakaszát tartalmazza *miniwhite* riportergén és annak enhanszere közé építve, míg a *102.103.2* jelű konstrukcióba a *Fab-7-iab-7* PRE régió HS3 hiperszenzitív szakaszának megfelelő minimál PRE-t építették. (3.1 ábra)



**3.1 ábra** A *Fab-7-iab-7* PRE régió felépítése

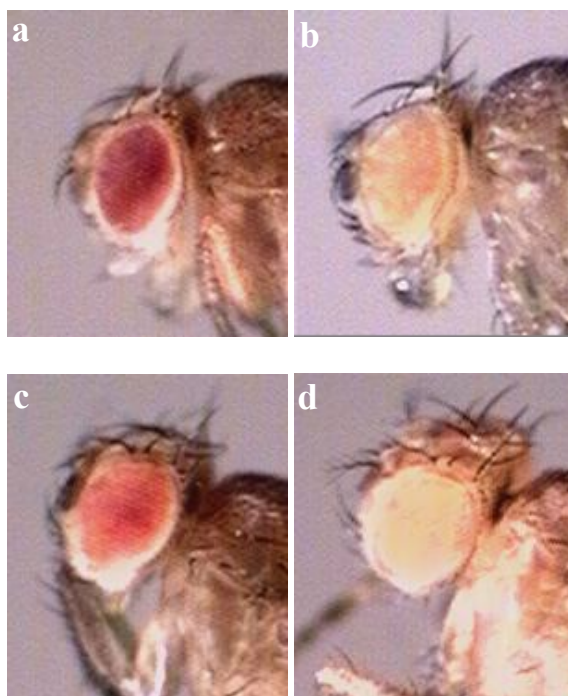
A HS-el jelölt négyzetek a nukleáz-hiperszenzitív helyeket jelölik. Fekete vonal jelöli a *18.73.1*, illetve a *102.103.2* transzgenikus konstrukciókba épített szakaszokat.



A 18.73.1 vonal felhasználásával EMS-, a 102.103.2 vonal felhasználásával röntgensugárzás-indukált mutagenézis kísérletet végeztünk, annak érdekében, hogy a *Polycomb*- és a *trithorax*-csoport új tagjait azonosítsuk.

### 3.1.1 Mutánsizolálási kísérlet a 18.73.1 transzgenikus konstrukció felhasználásával

A 18.73.1 jelű transzgént white háttéren homozigóta formában hordozó törzs hímjeit EMS-sel mutagenizáltuk, majd  $w/w$ ; 18.73.1/18.73.1 szűz nőstényekhez kereszteztük. Az első utódgenerációban megjelenő mintegy 230.000 állat között olyanokat kerestünk, amelyek szemszíne eltért a homozigóta 18.73.1 által meghatározott színtől (3.2 ábra).



**3.2 ábra** A 18.73.1 vonal szemszíne vad és mutáns háttéren

**a)**  $w/w$ ; 18.73.1/+ heterozigóta nőstény **b)**  $w/w$ ; 18.73.1/18.73.1 homozigóta nőstény **c)** sötétítő mutáció homozigóta 18.73.1 háttéren **d)** világosító mutáció homozigóta 18.73.1 háttéren

Azokat a vonalakat, amelyek a megváltozott szemszín öröklődését mutatták – a mutáns gén kromoszómára való térképezése után – törzsbe állítottuk. Ismert *Polycomb*- és

*trithorax*-allélokkal komplementációs analízist végeztünk, valamint jellemeztük a mutációkat a *Fab-7<sup>2</sup>* mutációra gyakorolt hatásuk alapján. A mutációk genetikai jellemzésének összefoglalását mutatja be a **3.1 táblázat**.

	<b>Fab-7<sup>2</sup> szuppresszor</b>	<b>Fab-7<sup>2</sup> enhanszer</b>	<b>Neutrális</b>
<b>2. kromoszómás sötétítők</b>	8 ismeretlen + 1 <i>Su(Pc)37D</i>	9 ismeretlen + 7 <i>Pcl</i> + 5 <i>Pis</i> + 1 <i>wg</i>	3 ismeretlen + 1 <i>Su(z)2</i>
<b>2. kromoszómás világosítók</b>	2 ismeretlen + 2 <i>Fes</i>	1 <i>Psc</i>	1 ismeretlen + 2 <i>Psc</i>
<b>3. kromoszómás sötétítők</b>	6 ismeretlen + 1 <i>bon</i> + 1 <i>gpp</i>	5 ismeretlen + 15 <i>Scm</i>	1 ismeretlen
<b>3. kromoszómás világosítók</b>	3 <i>bon</i>		

**3.1 táblázat** A *w/w; 18.73.1/18.73.1* törzs felhasználásával végzett EMS-mutagenézis kísérleteinkben izolált mutációk genetikai jellemzése

A *Polycomb*-, illetve a *trithorax*-csoport már korábban ismert tagjai közül kísérletünk során izoláltunk 1 *Su(Pc)37D*, 7 *Pcl*, 3 *Psc*, 15 *Scm* és 1 *Su(z)2* allélt. Izoláltunk két, eddig ismeretlen második kromoszómás komplementációs csoportot, melyeknek a *Fehér szem* (*Fes*; 2 allél) és *Piros szem* (*Pis*; 5 allél) nevet adtuk (A mutációk részletesebb leírását a **3.2.2** és **3.2.3** fejezetek tartalmazzák). A fentieken kívül azonosítottuk a *wingless* (*wg*) gén egy allélját is.

Az izolált mutációk némelyikének homeotikus fenotípusa nem felel meg a szemszínre gyakorolt hatás alapján várt fenotípusnak, hanem éppen ellentétes azzal (szemszín sötétítő

hatás és trithorax-jellegű homeotikus fenotípus). Ezeket a funkciónyerésesnek tűnő mutációkat röntgensugárzással megpróbáltuk revertálni. A reverziós kísérletek során (**3.1.2 fejezet**) kiderült, hogy izoláltunk 1 funkciónyeréses és 3 funkcióvesztéses *bonus* (*bon*) allélt, illetve 1 funkciónyeréses *grappa* (*gpp*) allélt is. Az általunk izolált *gpp* és *bon* allélokkal végzett kísérleteink részletes leírása a **3.2.4** és **3.2.5 fejezetekben** olvasható.

Az általunk izolált további 35 mutáció komplementálható az eddig megismert *Polycomb*-, illetve *trithorax*-gének mutációival, és egymással sem alkotnak komplementációs csoportot.

### 3.1.2 Reverziós kísérletek

Mivel a *18.73.1* vonallal végzett mutánsizolálási kísérleteinkben EMS-t használtunk mutagénként, valószínűsítettük, hogy funkciónyeréses allélokat is izolálni fogunk. Funkciónyerésesnek gondoltuk azokat a mutációkat, amelyek szemszínre gyakorolt hatása nem volt összhangban homeotikus fenotípusával, illetve a *Fab7<sup>2</sup>* mutációra gyakorolt hatásával. Ezeket az allélokat megpróbáltuk röntgen besugárzással revertálni.

Az izolált revertánsok lárvális nyálmirigy óriáskromoszómáit citológiai vizsgálatok közös töréspontot keresve. Az egyes revertánsokkal komplementációs analízist végeztünk egymás között, az eredeti mutáns alléllal, illetve ismert *Polycomb*- és *trithorax*-csoportba tartozó gének mutáns alléljaival. Így sikerült azonosítani a *bon* és *gpp* gének mutációit. Az általunk izolált EMS-indukált mutációk közül még további kettő bizonyult revertálhatónak (*15* és *24*; **3.2.6.3** és **3.2.6.5 fejezetek**).

A reverziós kísérletek során nem csak revertánsokat, hanem eddig ismeretlen szuppresszorokat is azonosítottunk, melyek – szemszínre gyakorolt világosító hatásuk alapján – várhatóan a *trithorax*-csoport új tagjai. Ilyen például a *VII*, a *V19* és a *PZ3* allélok által képviselt komplementációs csoport a második kromoszómán. Feltételezésünkkel ellentétben azonban mindhárom allél erősíti a *Pcl<sup>R5</sup>*, az *Scm<sup>D1</sup>*, az *Sce<sup>I</sup>* és a *Pc<sup>3</sup>* mutációk által okozott

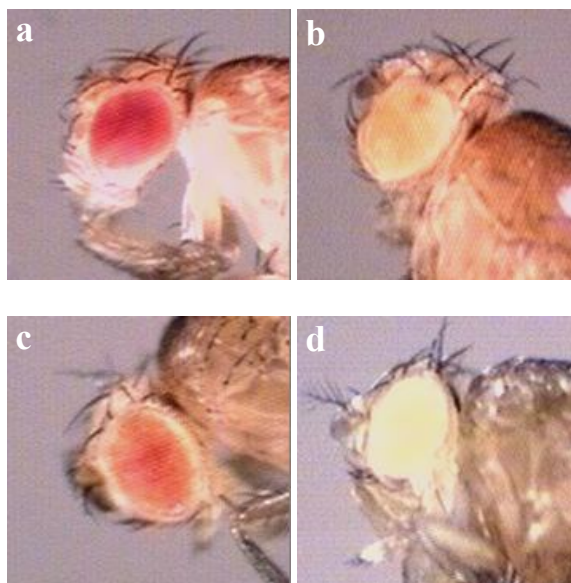
Polycomb-jellegű fenotípust (extra sex comb, Mcp, Cbx [Contrabithorax]). A komplementációs csoport legerősebb allélja a *PZ3*, mely az *Asx*<sup>1</sup> mutációval is domináns, Polycomb-jellegű interakciót mutat. A komplementációs csoport tagjai a *Fab-7*<sup>2</sup> mutációnak is enhanszerei, ami szintén POLYCOMB-szerű funkcióra utal. Ez a különös kettős fenotípus (trithorax-jellegű szemszín világosító hatás és Polycomb-jellegű homeotikus fenotípus) valószínűleg a *Polycomb*- és a *trithorax*-csoport génjei között fennálló szabályozási hálózattal magyarázható (**1.2.3.4 fejezet**).

Reverziós kísérleteinkben – amint az várható volt - az általunk azonosított *Fes* gén 3 újabb allélját (*Fes*<sup>V2</sup>, *Fes*<sup>V3</sup>, *Fes*<sup>V7</sup>) is izoláltuk a szemszínsötétítő mutációk szuppresszoraként.

### **3.1.3 Mutánsizolálási kísérlet a 102.103.2 transzgenikus konstrukció felhasználásával**

A 18.73.1 vonallal végzett kísérlet után azért választottuk a 102.103.2 vonalat további mutagenézis kísérleteinkhez, mert ez a konstrukció az *iab-7* PRE legszűkebb, még PRE-ként funkcionáló szakaszát tartalmazza. Így elkerülhető, hogy olyan mutációkat izoláljunk, amelyek támadáspontja az *iab-7* PRE szakaszon kívül eső valamely járulékos PRE- vagy TRE-jellegű szekvencia. Az új mutagenézis kísérletünkben röntgensugárzást alkalmaztunk mutagén ágensként, hogy elsősorban funkcióvesztéssel mutációkat nyerhessünk.

A 102.103.2 jelű transzgént *white* háttéren homozigóta formában hordozó törzs hímjeit röntgen besugárzással mutagenizáltuk, majd *w/w*; 102.103.2/102.103.2 szűz nőstényekhez kereszteztük. Az első utódgenerációban megjelenő mintegy 240.000 állat között olyanokat kerestünk, amelyek szemszíne eltért a homozigóta 102.103.2 által meghatározott szintől (**3.3 ábra**).



**3.3 ábra** A *102.103.2* vonal szemszíne vad és mutáns háttéren

**a)** *w/w; 102.103.2/+* heterozigóta nőstény **b)** *w/w; 102.103.2/102.103.2* homozigóta nőstény **c)** sötétítő mutáció homozigóta *102.103.2* háttéren **d)** világosító mutáció homozigóta *102.103.2* háttéren

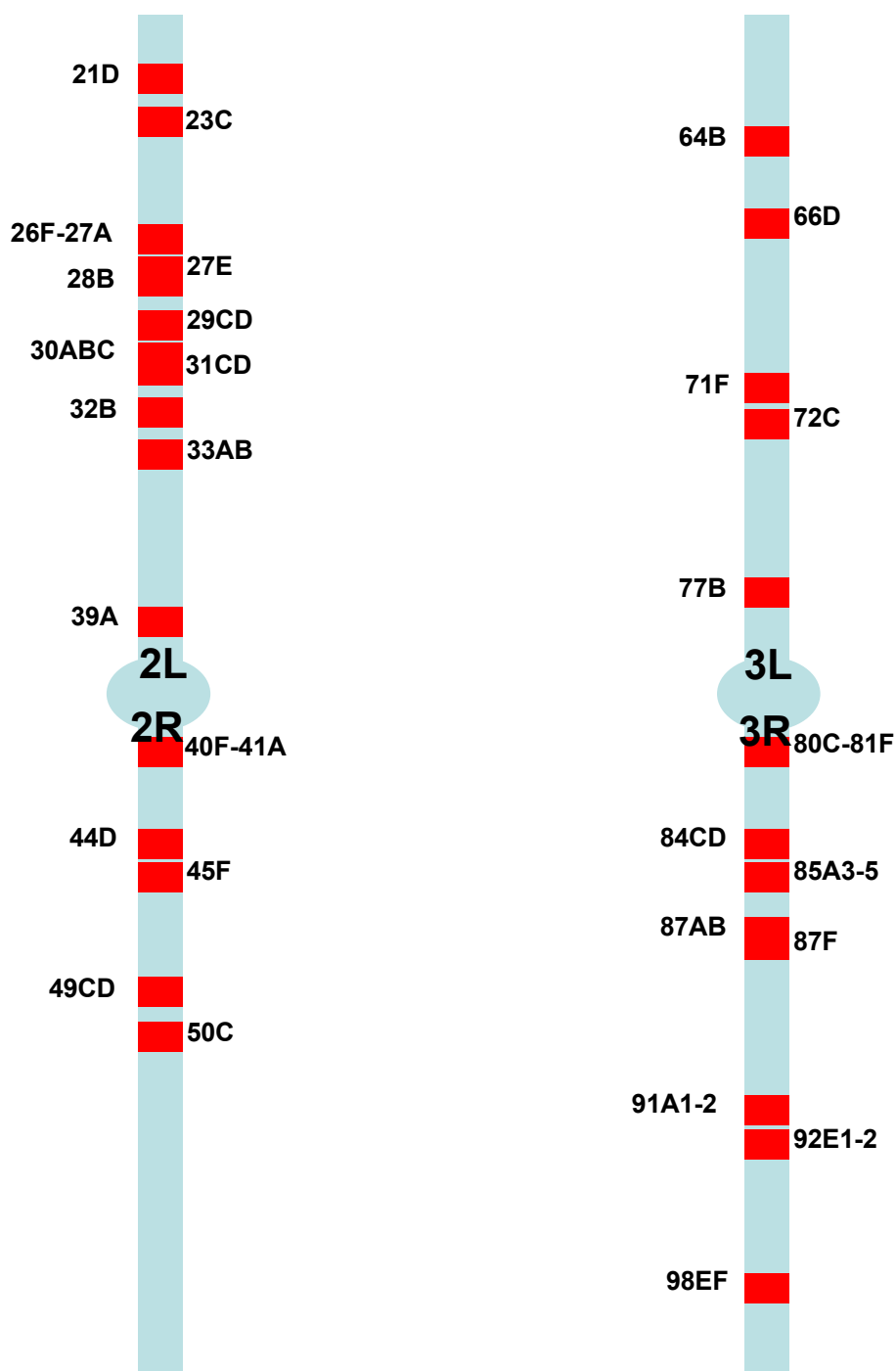
A jelöltek által hordozott mutációkat kromoszómára térképeztük, majd törzsbe állítottuk. A beállított vonalakon citológiai vizsgálatot végeztünk. Több mutáció esetében a 29EF régióban találtunk átrendeződést; erről a kromoszómális pozícióról azt valószínűsítettük, hogy ez a konstrukció integrációs helye lehet. Azért gondoltunk erre, mert ha a konstrukció helyének párosodása a homológ kromoszómával sérül, abban az esetben a konstrukción kialakuló gátlás megszűnik. Az általunk talált egyéb kromoszómális töréspontokat a **3.4 ábra** foglalja össze.

Mivel a *18.73.1* vonallal végzett kísérleteink alapján a *Fes* és *Pis* gének különösen érdekesnek bizonyultak, a *102.103.2* vonallal végzett mutagenézis kísérlet során izolált mutációk közül komplementációs analízissel elsősorban ezen két gén alléljait kerestük. A

harmadik kromoszómás mutációkat ismert *Polycomb*-, illetve *trithorax*-csoportba tartozó gének mutációival kereszteztük, esetleges allélizmust, vagy interakciókat keresve.

A 102.103.2 vonallal végzett kísérletünk során a *Pis* gén 3, míg a *Fes* gén 2 allélját sikerült azonosítanunk. Ezen felül izoláltunk még 6 *Pcl*, 1 *Su(z)12*, 1 *vtd*, 1 *bon* és 2 *wg* allélt is. Azonosítottunk 2 *male-specific lethal (msl)*-típusú mutációit is, illetve a *Df(3L)kto2* deléción által lefedett régióba eső egyik gén 3 allélját, melyek valószínűleg egy új lókuszt jelölnek ki. Ezt a feltételezett lókuszt a továbbiakban *kto2* (*kohtalo2*)-ként jelölöm.

Az ismert és ismeretlen komplementációs csoportokat mutatja be a **3.2 táblázat**.



**3.4 ábra** A *102.103.2* vonallal végzett röntgensugárzás-indukált mutagenézis kísérlet során nyert kromoszómaátrendeződések által érintett kromoszómális régiók

Az ábrán a *102.103.2* konstrukció pozícióját jelentő 29E-F2 régió – ahol szintén kaptunk töréspontokat - nincs feltüntetve.

	Azonosított	Ismeretlen
<b>2. kromoszómás sötétítő</b>	3 <i>Pis</i> 2 <i>wg</i> 6 <i>Pcl</i>	38
<b>2. kromoszómás világosító</b>	1 <i>Fes</i>	0
<b>3. kromoszómás sötétítő</b>	1 <i>vtd</i> 1 <i>Su(z)12</i> 3 <i>kto2</i> 2 „ <i>msl</i> ”	4
<b>3. kromoszómás világosító</b>	1 <i>bon</i>	8

**3.2 táblázat** A *w/w*; 102.103.2/102.103.2 törzs felhasználásával végzett röntgen-mutagenézis kísérleteinkben izolált mutációk genetikai jellemzése

### 3.1.4 A mutánsizolálási kísérletek során tett megfigyelések

Hagström és munkatársainak 1997-es publikációja alapján várható volt, hogy kísérleteink során azonosítani fogjuk azon korábban ismert gének mutációit, melyek hatással vannak az általunk használt konstrukciók szemszínére. A várákozásnak megfelelően azonosítottunk több *Pcl* és *Scm* allélt. A *Pc* és a *Sce* gének alléljait nem izoláltuk. Nem azonosítottunk egyetlen *E(z)*, *Trl* és *trx* allélt sem, pedig ezen gének mutációi Hagström és munkatársai szerint hatnak a 18.73.1 vonal szemszínére. Ezen ellentmondás feloldása céljából magunk is teszteltük az említett géneknek a homozigóta 18.73.1 szemszínére gyakorolt hatását. Kísérleteink szerint a publikációban szereplő adatokkal ellentétben sem a *trx*, sem a *Trl*<sup>l<sup>3C</sup></sup> mutáció heterozigóta formában nincs hatással a szemszínre, így nem meglepő, hogy



mutációikat nem azonosítottuk. Az  $E(z)$  gén mutációi ( $E(z)^I$ ,  $E(z)^{Trm}$ ,  $E(z)^{son3}$ ,  $E(z)^{60}$ ) valóban sötétítik a transzgenikus szemszínt, általunk ismeretlen okokból (valószínűleg a nem túl erős sötétítő hatás miatt) azonban nekünk nem sikerült új alléljaikat azonosítani. Fontos még megemlíteni, hogy a 102.103.2 vonallal végzett mutagenézis kísérletünk során nem azonosítottunk egyetlen *Scm* allélt sem, annak ellenére, hogy az általunk megvizsgált  $Scm^{D1}$  allél jelentősen sötéti a 102.103.2 vonalra jellemző szemszínt.

A két kísérlet során a már korábban ismert gének közül azonosítottuk a *wg* gén 3 allélját, a *Su(Pc)37D* gén 1 allélját, a *Psc* gén 3 allélját, a *Su(z)2* gén 1 allélját, a *Scm* gén 15 allélját, a *Pcl* gén 13 allélját, a *vtd* gén 1 allélját, a *Su(z)12* gén 1 allélját, a *bon* gén 5 allélját és a *gpp* gén 1 allélját. Azonosítottunk ezen felül 2 *msl*-típusú mutációt, és egy olyan, eddig ismeretlen gén 3 allélját, mely a *Df(3L)kto2* által lefedett régióba esik. A *Pis* gén 8, a *Fes* gén 3 allélját azonosítottuk összesen a két mutagenézis kísérlet során.

Egyes allélok (*Su(Pc)37D*, *Psc*, *vtd*) a várttal ellentétes hatást mutatnak a konstrukció által kialakított szemszínre; ezek feltételezhetően nem közvetlenül hatnak a konstrukcióban lévő PRE szakaszra, hanem valamely más, *Polycomb*- vagy *trithorax*-csoportba tartozó gén szabályozásán keresztül. A másik lehetőség, hogy egyes mutációk az adott gének nem egyszerű funkcióvesztéses, hanem különleges, funkciónyeréses alléljai. Azokat az allélokat, ahol ez a gyanú felmerült (3.2.4, 3.2.5 és 3.2.6 fejezetek) röntgen reverziós kísérletnek vetettük alá.

A reverziós kísérletek, azon túl, hogy egyes esetekben lehetővé tették az EMS-sel végzett mutagenézis kísérletből származó allélok azonosítását, komoly segítséget nyújtottak az azonosított génekkel végzett későbbi kísérletekben is. A *gpp* gén esetében az általunk azonosított töréspontok segítették a gén klónozását.

A *bon* gén azonosítása a további mutagenézis kísérletek szempontjából is elsődleges fontosságú volt. A *bon* gén funkcióvesztéses mutációi a transzgenikus állatok szemszínét

világosítják, emiatt a *bon* allélok szuppresszoraként viselkednek azokban a kísérletekben, amelyekben a sötétítő hatású mutációkat a szemszín alapján próbáljuk revertálni. A *bon* gén alléljait bármely reverziós screen jelöltjei közül érdemes elsőként kiszűrni, ugyanis a *bon* allélok nagyon gyakoriak. Ennek lehetséges oka a gén nagy mérete (~35 kb), illetve a funkcióvesztéses *bon* allélok erős világosító hatása. A revertáns *bon* allélokat használtuk az EMS mutagenézis kísérletek során izolált harmadik kromoszómás világosító jelöltek komplementációs analíziséhez is.

A szuppresszorok, amellet, hogy a reverziós kísérletek melléktermékei, olykor hasznosnak bizonyulhatnak. Sötétítő mutációk szuppresszoraként izoláltunk 3 *Fes* allélt, és egy háromtagú második kromoszómás komplementációs csoportot is. Ezek a mutációk az eredeti sötétítő mutációtól elválasztva világosították a transzgenikus konstrukció által kialakított szemszínt.

Mutánsizolálási kísérleteinkben mindkét transzgénnel izoláltunk olyan sötétítőket, illetve világosítókat, amelyekben a mutáció a transzgenikus konstrukciót érintette. A világosítókból a *miniwhite* riportergén, illetve a *white enhancer* szenvedett károsodást. Az így mutálódott konstrukciót heterozigóta állapotban hordozó legyek szemszíne fehér. A sötétítők esetében vagy a teljes konstrukció kiesett a genomból (ekkor a károsodott konstrukcióra nézve homozigóta legyek szemszíne fehér), vagy a PRE funkciója károsodott (ekkor a konstrukcióra nézve homozigóta legyek szemszíne sötétebb a heterozigótáénál, és a sötétítő jelleget nem lehet rekombinációval eltávolítani a konstrukciótól). A 18.73.1 vonal háttérében legalább 4 olyan mutációt izoláltunk, mely a konstruktot érinti, a 102.103.2 konstrukció háttérében a töréspontok alapján 15 vonalról gyanítjuk, hogy a konstrukció, vagy annak párosodása szenvedett károsodást. Ilyen jellegű mutációk a reverziós kísérletek során is rendszeresen előfordultak. Különösen fontosak a konstrukcióban található PRE szakasz EMS-

indukált mutációi. A mutációt szenvedett PRE szekvenálásával esetleg azonosíthatók lesznek a PRE funkciójához szükséges fehérjék kötőhelyei.

A reverziós kísérletek során megfigyeltük azt is, hogy egyes szemszínre ható mutációk, például a *scarlet* (*st*) és a *claret* (*ca*) homozigóta recesszív formában világosítják a transzgenikus konstrukció által kialakított szemszínt. Mivel a *TM3* kromoszóma hordozza a *st*, a *TM6* pedig a *ca* markert, egyes esetekben a revertálandó mutációk szuppresszoraként ezen két gén alléljait izoláltuk.

Mivel a *102.103.2* vonallal végzett mutánsizolálási kísérletből származó sötétítő mutációk esetében több olyan kromoszómális átrendeződést figyeltünk meg, amely a második kromoszóma 29-es régiójának közelében okoz törést, azt gondoltuk, hogy ez a régió közel eshet a *102.103.2* integrációs helyéhez. Azt feltételeztük, hogy az átrendeződések minden bizonnyal megzavarják a konstrukció párosodását, emiatt sötétítik a transzgenikus állatok szemszínét. Hogy igazoljuk ezt a hipotézist, és hogy megállapítsuk az általunk használt transzgenikus konstrukciók beépülési helyét a kromoszómába, a *white* gén egy szakaszát használva próbaként *in situ* hibridizációt végeztünk lárvális nyálmirigy óriáskromoszómákon. A felhasznált lárvák homozigóta formában hordozták a vizsgálni kívánt transzgenikus konstrukciót. Az endogén *white* gén kromoszómális pozíciójának megfelelő jel mellett mindkét vonal esetében csupán egy hibridizációs jelet kaptunk. Vizsgálataink alapján a *102.103.2* transzgenikus konstrukció a 29E-29F2 régióban, míg a *18.73.1* konstrukció az 54E-54F2 régióban lokalizálódik.

### **3.2 A kísérletek során izolált érdekesebb mutációk további vizsgálata**

#### **3.2.1 Ellentmondásos fenotípust mutató funkcióvesztéses mutációk**

A *Su(Pc)37D* gén általunk azonosított mutációja szemszínsötétítő hatású, bár ennek ellenkezőjére számíthatnánk, hisz a gén a *trithorax*-csoport tagja. A *Su(Pc)37D* génnek egy

allélja volt csupán ismert korábban (<http://flybase.org>), kísérleteink szerint ez is sötétíti a *18.73.1* transzgén által meghatározott szemszínt. Ezek alapján az általunk azonosított allél valószínűleg nem funkcionyeréses. A *Su(Pc)37D* fehérje valószínűleg nem hat közvetlenül az *iab-7* PRE-ra, a sötétítő hatás annak tudható be, hogy a mutáció miatt lecsökken a *Su(Pc)37D* által regulált POLYCOMB-fehérjék mennyisége, aminek következtében a transzgenikus konstrukción a gátlás meggyengül.

Hasonló okai lehetnek annak is, hogy az általunk azonosított *vtd* allél (*trxG*) szintén sötétíti a *18.73.1*-es vonal szemszínét.

A *Psc* gén alléljait mind a mutagenézis kísérletekben, mind a reverziós kísérletekben – mint szuppresszorokat – izoláltunk. Ezek az allélok is ellentétes módon viselkednek, mint ahogy várjuk: annak ellenére világosítják a szemszínt, hogy a *Psc* a *Polycomb*-csoport tagja. Valószínűleg a PSC maga nem vesz részt a PRE-n kialakuló represszor komplex felépítésében, de szerepe lehet az *iab-7* PRE-n jelen lévő POLYCOMB-csoportba tartozó fehérjék génjének represszáálásában. A PSC géntermék mennyiségének csökkenése miatt ezen gének derepresszáálódnak, fehérjetermékük mennyisége megnő, így a transzgén gátlása erősödik.

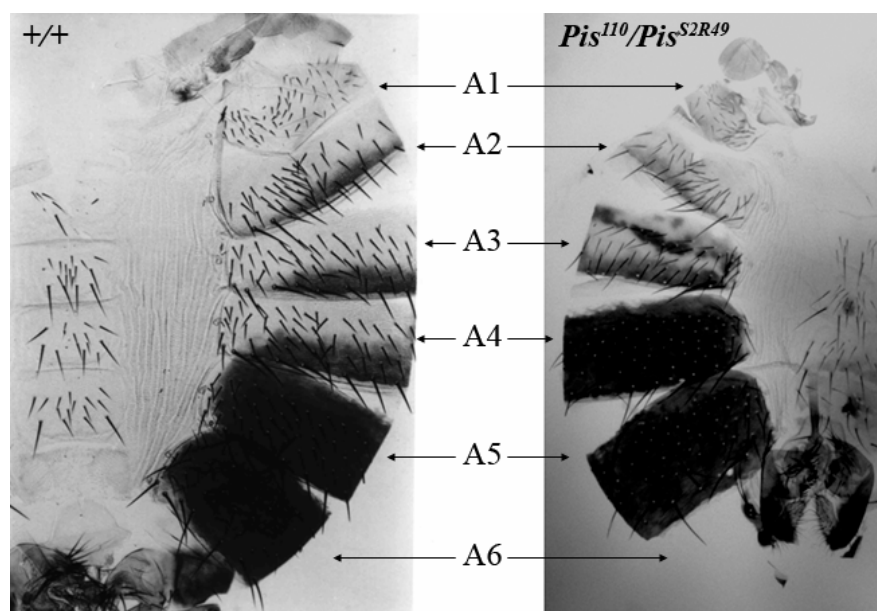
Korábbi kísérletekben megállapították, hogy a *Psc* funkcióvesztéses mutációja a SU(Z)2 géntermék mennyiségének növekedését okozza (Wu és Howe, 1994). Valószínűleg a mi mutációink esetében is ez történik, és a SU(Z)2 géntermék mennyisége van közvetlen hatással a konstrukcióban lévő PRE-ra. Ezt a feltételezésünket az is alátámasztja, hogy a *18.73.1* vonallal végzett mutagenézis kísérletünkben azonosítottunk egy *Su(z)2* allélt, mely a szemszínt sötétíti.

### 3.2.2 *Piros szem (Pis) (CG16975)*

Eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a *18.73.1* konstrukció által hordozott silencer (az *iab-7* PRE) három gén dózisára különösen érzékeny, ugyanis mutációik a transzgenikus szemszint nagyon erősen sötétítik. Ezek közül kettő már korábban ismert volt (*Scm* és *Pcl*). A harmadikat, melynek mutációja a szemszint erősen sötétítette, *Piros szem*-nek (*Pis*) neveztük el. Eddig 5 EMS- illetve 9 röntgensugárzás-indukált allélját izoláltuk laborunkban. A korábban más módszerekkel (*Fab-7* enhanszer hatás alapján) izolált allélok közül nem mindegyik sötétíti erősen a transzgenikus konstrukciók által kialakított szemszint.

A *Pis* egyes alléljai *Mcp* fenotípust mutatnak, illetve a *Fab-7<sup>2</sup>* mutáció enhanszerei, sőt egy EMS-indukált allél kivételével (*Pis<sup>48</sup>*) mindegyik erősíti a *Fab-7<sup>1</sup>* mutáció fenotípusát is. A *Pis* gén alléljai erős genetikai interakciót mutatnak az *Scm*, illetve a *Pcl* gének mutációival is (az *Mcp* és az *esc* fenotípusok enhanszerei). Ezen megfigyelések arra utalnak, hogy a *Pis* fehérjének kulcsfontosságú szerepe van a POLYCOMB-komplex létrehozásában, valamint, hogy működése nem korlátozódik az *iab-7* PRE szakaszra (**3.5 ábra**).

A *Pis* gén alléljainak komplementációs analízise, és deléciókkal való térképezése a CG16975 annotált génre irányította a figyelmünket. Időközben közzéttek egy új *Polycomb*-gén (*dSfmbt*) klónozását a régióban (Klymenko és mtsai, 2006), melynek alléljával komplementációs keresztezést végezve a *Pis* allélikusnak bizonyult. Klymenko és munkatársai a *dSfmbt* gén fehérjetermékét a PHO fehérjével együtt tisztították a PHORC (PHO Repressive Complex) részeként. Kimutatták, hogy a DSFMBT fehérje MBT-doménje a H3 hiszton K9 aminosavának és a H4 hiszton K20 aminosavának mono- és dimetilált formájához köt, de nem ismeri fel sem a trimetilált, sem a metilálatlan formákat.



**3.5 ábra** A *Pis*<sup>110</sup>/*Pis*<sup>S2R49</sup> interallélikus kombináció fenotípusa

Az ábra bal oldalán egy vad típusú, jobb oldalán egy *Pis*<sup>110</sup>/*Pis*<sup>S2R49</sup> genotípusú légy potroha látható. A *Pis*<sup>110</sup>/*Pis*<sup>S2R49</sup> legyek minden potrohszelvénye a mögötte elhelyezkedő szelvényhez válik hasonlóvá. A hatodik potrohszelvény eltűnik (Fab-7 fenotípus), a negyedik az ötödikhez hasonlóan fekete pigmentációjú (Mcp fenotípus), a harmadik szelvényen szintén fekete klónok figyelhetők meg. A potrohszelvényeket A1-től A6-ig jelöltük. (A *Pis*<sup>S2R49</sup> allélt a 102.103.2 transzgenikus konstrukció hátterében izoláltuk röntgensugárzás segítségével, a *Pis*<sup>110</sup> mutációt laborunkban Ardó László izolálta.)

Ezen ismeretek birtokában kijelenthetjük, hogy a *Pis* mutációk hatása az *iab-7* PRE szakaszra közvetlen, hiszen a PIS-DSFMBT az *iab-7* PRE szakaszon felépülő komplex esszenciális része.

A PIS fehérje nem csupán a homeotikus gének szabályozásában tölt be fontos szerepet. Mind a homozigóta *Pis*<sup>55B</sup> és *Pis*<sup>110</sup>, mind a *Pis*<sup>55B</sup>/*Pis*<sup>110</sup> interallélikus kombinációt hordozó lárvákban fokozott vérsejt-proliferáció, valamint a kristálysejtek számának növekedése és spontán lamellocita képződés figyelhető meg. Mindkét *Pis* allél röntgen besugárzással

keletkezett. Míg a  $Pis^{55B}$  genetikai értelemben null allél, a  $Pis^{110}$  egy életképes hipomorf allél, amely egy bizonyos alfunkciójára nézve antimorfnak tekinthető. Mindkét allél a Polycomb-jellegű homeotikus fenotípusok enhanszere és az  $E(z)^{Trm}$  fenotípusának erős szuppresszora (Bajusz Izabella személyes közlése).

### 3.2.3 Fehér szem (*Fes*)

Mindkét transzgenikus vonallal végzett kísérletünkben, illetve – mint szuppresszort - a reverziós kísérletek során is izoláltuk annak a második kromoszómás génnek a mutációit, melynek a transzgenikus szemszínre gyakorolt erős világosító hatása miatt a *Fehér szem* (*Fes*) nevet adtuk. Az általunk izolált összes allél (EMS-indukált allélok:  $Fes^{91AV}$ ,  $Fes^{120(V)2}$ ,  $Fes^{V1R39A}$ ; röntgen-indukált allélok:  $Fes^{V2}$ ,  $Fes^{V3}$ ,  $Fes^{V7}$ ) a *Fab-7<sup>2</sup>* mutáció fenotípusának erős szuppresszora. Ezek alapján a *Fehér szem* valószínűleg a *trithorax*-csoport eddig ismeretlen tagja.

A mutáció a *black* (*b*) (34D1) és a *purple* (*pr*) (38B3) markergének közé térképeződik, a *b*-től kb. 2, a *pr*-től kb. 4 cM-re. A régiót átfedő deléciósorozattal kikeresztezve a  $Fes^{V3}$  jelű röntgen-indukált allél azonban egyik delécióval sem mutat letalitást, csupán a *Df(2L)b75* delécióval figyelhető meg a hímeken *iab-6<sup>-</sup>* fenotípus. A *Fes* allélok egymással sem mutatnak minden esetben letalitást: bár az általunk izolált allélok nem komplementálnak, a laborunkban korábban Blastyák András által izolált  $Fes^{S64A1}$  (röntgen-indukált *Fes* allél) komplementálja a  $Fes^{V2}$  és a  $Fes^{V7}$  allélokat. Ez az eredmény – valamint az, hogy a *Fes* a régiót átfedő deléciókkal szemben sem letális -, arra utal, hogy lehetséges, hogy az általunk izolált *Fes* allélok funkcionyeréses természetűek.

A *Fes* mutációt a *18.73.1* transzgént hordozó kromoszómáról rekombinációval eltávolítottuk, így lehetővé vált a mutáció más típusú PRE-t tartalmazó konstrukciókra gyakorolt hatásának vizsgálata. A *Fes* géntermék mennyiségére más, *iab-7* PRE-t tartalmazó transzgének is érzékenyek, míg az *Mcp* PRE-t hordozó transzgenikus konstrukciók

érzékenyen. Ennek alapján azt mondhatjuk, hogy a FES fehérje hatása valószínűleg specifikus az *iab-7* PRE szakaszra.

### 3.2.4 *grappa*<sup>94A</sup>

A harmadik kromoszómára volt térképezhető a *18.73.1* vonallal végzett mutagenézis kísérletben azonosított *94A* jelű mutáció, mely a szemszínt erősen sötétítette, ugyanakkor *iab-5*<sup>-</sup>, vagyis *trithorax*-jellegű homeotikus fenotípust mutatott. A mutáció homozigóta formában késői bábletális. A ki nem kelő, homozigóta állatok a *trithorax*-csoport tagjainak mutációira jellemző fenotípust mutatnak: erős *iab-5*<sup>-</sup>, *iab-6*<sup>-</sup> és gyenge *iab-7*<sup>-</sup> fenotípusúak, harmadik lábukon is megtalálható az egyébként csak a második lábra jellemző apikális szőr, a középtorukon *engrailed* (*en*) mutációra jellemző fenotípusú klónok figyelhetők meg. Az *en* egy úgynevezett szegment polaritás gén, mely a homeotikus génekhez hasonlóan POLYCOMB- és TRITHORAX-fehérjék szabályozása alatt áll (Kassis és mtsai, 1989). Az *engrailed* fenotípus tehát *trithorax*-funkcióvesztésre utal. Mivel a szemszínre gyakorolt sötétítő hatás alapján nem várnánk, hogy a mutáns *trithorax* fenotípust mutasson, azt kellett feltételeznünk, hogy a *94A* egy funkciónyeréses allél.

A *94A* jelű mutációt röntgen besugárzással revertáltuk. A reverziós screen során kb. 45.000 állatot néztünk át, 21 revertáns törzset állítottunk be. Genetikai interakciók alapján feltételezzük, hogy a vonalak közül 19 teljes, míg 2 (a *gpp*<sup>R1-94A</sup> és a *gpp*<sup>R3-94A</sup>) csupán parciális revertáns.

A revertáns vonalakkal komplementációs analízist végeztünk. A revertánsok egy része egymással korai letális, más részük késői bábletális. A revertáns kromoszómák citológiai vizsgálata során megállapítottuk, hogy egy részükben jól látható kromoszóma-átrendeződések találhatók, amelyek egyik töréspontja minden esetben a 83EF citológiai régióba esik. Ebbe a citológiai régióba (83E6-83E7) térképeződik egy korábban megismert, *trithorax*-csoportba tartozó gén, a *grappa*. Ezért a *94A* revertánsokat a *grappa*<sup>X</sup> allállal komplementáltattuk. Azt



találtuk, hogy a *94A* revertánsok a *grappa*<sup>X</sup> alléllal késői bábletálisok. A *94A* tehát a *grappa* gén egy funkcionyeréses alléljának bizonyult.

A *grappa* alléljai nem viselkednek egységesen a *Polycomb*-csoportba tartozó gének mutációival adott interakcióikban. Amíg például a *gpp*<sup>1A</sup> enhanszere, addig a *gpp*<sup>94A</sup> szuppresszora az *Sce*, a *Pcl* és az *Scm* mutációk fenotípusának.

A *gpp* gén mutáns alléljai gyengítik a kromoszómák telomerjének közelébe helyezett riportergén represszióját, de nincsenek hasonló hatással a centromerikus PEV (Pozíció Effektus Variégáció) esetén. A telomerikus silencing gyengítése tekintetében a *gpp*<sup>94A</sup> a gyengébb allélok közé sorolható (Shanower és mtsai, 2005).

A *gpp* gén hossza 42 kb, az általa kódolt RNS-ek 6,5-10 kb hosszúságúak. A gén 12 potenciális RNS-t kódol, melyek 5 exonban azonosak. A génről termelődő RNS-ek összetételének profilja az egyedfejlődés során változik. A GPP fehérje (171-232 kDa) N-terminális doménje szignifikáns (~42%-os) homológiát mutat a *S. cerevisiae* DOT1 fehérjével, de a *grappa* fehérjének több olyan doménje is van, ami az élesztő DOT1-ben nem található meg (coiled coil domén, ATP/GTP kötő domén, alanin-, prolin-, hisztidin-, glutamin-gazdag régió).

Az élesztő DOT1 fehérje a H3-as hiszton K79 metiltranszferáz enzimjeként működik. Imágókorongok immunfestésével, illetve az imágókorongokból izolált fehérjéknek a K79-es pozíciójában metilált H3-as hiszton elleni ellenanyaggal végzett Western blotjával kimutatható, hogy a *gpp* mutáns egyedekben a H3-as hiszton K79 aminosavjának metilációs szintje a normálisnál alacsonyabb. Ez arra utal, hogy a GPP fehérje, élesztő homológjához hasonlóan H3 K79 metiltranszferázként viselkedik (Shanower és mtsai, 2005).

### 3.2.5 *bonus*<sup>117A</sup>

A mutánsizolálási kísérletünk során talált harmadik kromoszómás mutációk közül a *117A* jelű mutáció sötétítette legerősebben a *18.73.1* transzgenikus konstrukció által kialakított szemszínt. A homozigóta mutáns egyedek életképesek, szemszínük a vad típushoz hasonló piros. A heterozigóta állatok *iab-5<sup>-</sup>* fenotípust mutatnak. Meglepő módon, a homozigótáknak az *iab-5<sup>-</sup>* fenotípusa gyengébb, a homozigóta anyáktól származó homozigóta legyek pedig nem is mutatnak *iab-5<sup>-</sup>* fenotípust. A *117A* gyenge, klonális *Fab-7<sup>2</sup>* szuppresszor.

A szemszín alapján tehát a *117A* egy *Polycomb*-jellegű gén funkcióvesztéses alléljának tűnt, míg homeotikus fenotípusa (*iab-5<sup>-</sup>*) trithorax-szerű volt. Ezek alapján úgy gondoltuk, hogy a *117A* funkciónyeréses mutáció. Ezt alátámasztotta, hogy a *117A* röntgensugárzással revertálhatónak bizonyult.

A reverziós screen során kb. 60.000 légy között kerestünk revertánst, 21 revertáns vonalat állítottunk be. A revertánsok szemszíne hasonló a *18.73.1* vonal homozigóta szemszínéhez, vagy világosabb annál. A revertánsok transzheterozigóta állapotban általában késői bábletálisok, és többnyire csak a nőstények érik el ezt a kort. A bábból kiboncolt homozigóta állatoknak nincs látható homeotikus fenotípusa. Egyes kombinációkban a transzheterozigóta hímek is elérik a farát adult állapotot, vagyis a bábbőrben későn, már kiszíneződött állapotban pusztulnak el, sőt, olykor ki is kelnek. A revertánsok a *Fab-7<sup>2</sup>* mutáció gyenge, vagy közepes szuppresszorai.

A revertánsok óriáskromoszómáit citológiaiailag vizsgáltuk. Négy revertáns törzs kromoszómái mutattak közös töréspontot a 92E régióban. Kikerestük az ebben a régióban P-elemet hordozó vonalakat Maróy Péter és Szidonya János törzsgyűjteményéből. A 92E régióba esett a BONUS nevű transzkripció faktor kódoló gén három P-elemes allélja (*bon*<sup>241/8</sup>, *bon*<sup>249/12</sup>, *bon*<sup>487/6</sup>). (A <http://flybase.org> adatai alapján a *bonus* gén pontosított pozíciója:

92F2-92F3.) A három allélt elkértük, komplementációs analízist végeztünk. A revertánsok allélikusnak bizonyultak a *bon* gén P-elem-indukált alléljaival. A P-elem-indukált allélok közül a *bon*<sup>487/6</sup> bizonyult a legerősebbnek, ez a *bon*<sup>117A</sup> összes revertánsával letális volt. A másik két P-elem-indukált allél gyengébbnek mutatkozott, a *bon*<sup>117A</sup> revertánsokkal egyes kombinációkban kikelő nőtényeket figyeltünk meg, amelyek szárnya furesa, gyűrött fenotípust mutatott. A *bon*<sup>R13-117A</sup> jelű revertánst a *bon*<sup>249/12</sup> jelű alléllal keresztezve hímek is kikelnek, amelyek szintén mutatják a jellegzetes szárnyfenotípust.

A *bon*<sup>249/12</sup> P-elem mobilizálásával 18 olyan excíziós mutáns törzset állítottunk elő, melyek az általunk izolált leggyengébb, funkcióvesztéses *bon*<sup>R13-117A</sup> (*bon*<sup>117A</sup> revertáns) alléllal szemben letálisok. Feltételezésünk szerint ezek az allélok a P-elem pontatlan kivágódásával keletkeztek. Az ezen módszerrel izolált összes funkcióvesztéses *bon* allél világosítja a homozigóta 18.73.1 vonal szemszínét.

A fentiek alapján azt mondhatjuk, hogy a 117A a *bon* funkciónyeréses allélja. A revertánsok és a P-elem kivágódásával keletkezett allélok allélikusnak bizonyultak több EMS-indukált világosító mutációval is, melyek a *bon* funkcióvesztéses alléljai. Ezek a funkcióvesztéses allélok (*bon*<sup>P9D(L)</sup>, *bon*<sup>P45a(L)</sup> és *bon*<sup>P9c(L)</sup>) világosítják az *Mcp* PRE-t tartalmazó transzgenikus konstrukció által kialakított szemszínét is. Ennek alapján úgy véljük, hogy a BON fehérje működése nem specifikus az *iab-7* PRE szakaszra. Kísérleteink során az is kiderült, hogy a *bon* gén funkcióvesztéses mutációi csak azoknak a transzgenikus konstrukcióknak a szemszínét világosítják, amelyek a *white enhancer* szakaszt is tartalmazzák, a világosító hatáshoz azonban a PRE jelenléte is elengedhetetlen.

A *bon* gén szerepét a lárvális perifériális idegrendszer és bél fejlődésében már korábban kimutatták (Salzberg és mtsai, 1997; Beckstead és mtsai, 2000). A BON fehérje homológjai egérben és emberben a TIF1ALPHA, a TIF1BETA és a TIF1GAMMA (TRANSCRIPTION INTERMEDIARY FACTOR 1). A TIF1 család tagjai transzkripciós aktivátorok és represszorok,

többnek is szerepe van a szteroid hormonok által kiváltott génaktiváció létrejöttében. A család több tagja kapcsolatba lép hiszton-deacetilázokkal illetve kromoszómális proteinekkel (Fraser és mtsai, 1998; Nielsen és mtsai, 1999; Venturini és mtsai, 1999; Cammas és mtsai, 2002; Remboutsika és mtsai, 2002; Cammas és mtsai, 2007).

A BON fehérje homológjaihoz, a TIF1 család tagjaihoz hasonlóan egy RBCC (RING finger, B box-ok, coiled coil) motívumot tartalmaz a fehérje N-terminális részén. Ezeken a doméneken kívül található még egy PHD finger és egy bromodomén is a BON fehérje szekvenciájában. Ez a doménszerkezet, valamint az a megfigyelés, hogy a BON fehérje az óriáskromoszóma több száz sávjához kötődik, arra utalnak, hogy a fehérje a kromatinszerkezet szintjén látja el feladatát. Ezt alátámasztja a *bon* mutáció PEV-re gyakorolt hatása, a fehérje egyes nukleáris receptorokkal való interakciója, valamint azok az élesztő két-hibrid kísérletek, melyek szerint a BON kölcsönhatásba lép a POLYCOMB-csoport egyes tagjaival is (Beckstead és mtsai, 2001; Beckstead és mtsai, 2005).

Az irodalmi adatok alapján tehát a BON fehérje génregulátorként működik, a mi kísérleteink pedig arra utalnak, hogy a homeotikus gének regulációjában a TRITHORAX-csoport tagjaként vesz részt. Ezen következtetésünk további megerősítésére egy kísérletünkben az *iab-6<sup>-</sup>* homeotikus fenotípus alapján vizsgáltuk, hogy a *bon* mutáció erősíti-e a *trx* gén mutációja által okozott homeotikus fenotípust. A *bon*  $\otimes$  *trx* keresztezéseket mindkét irányból elvégeztük. Az eredmények értékelésénél két különböző mérőszámot vettünk figyelembe: a **3.3 táblázat**ban feltüntettük, hogy az utódok hány százaléka mutatja az *iab-6<sup>-</sup>* fenotípust, illetve, hogy átlagosan az utódok egyetlen hatodik sternitjén hány szőr jelenik meg. Mind az általunk vizsgált funkciónyeréses (*bon<sup>117A</sup>*), mind a funkcióvesztéses *bonus<sup>P9c(L)</sup>* (EMS-indukált világosító) allél erősítette a *Df(3R)red trx* által okozott *iab-6<sup>-</sup>* fenotípust, ha az anya hordozta a *trx* mutációt. A másik irányból végezve a keresztezést csak a funkciónyeréses *bon<sup>117A</sup>* allél bizonyult a *trx* gyenge enhanszerének.

A *bon*<sup>P9c(L)</sup> funkcióvesztéses, világosító allél a *ph*<sup>410</sup> (erős *ph* allél) által mutatott Polycomb-jellegű fenotípusokat (*Fab-7*, *Mcp*, *Cbx*) jól szuppresszálja. A *bon*<sup>117A</sup> funkciónyeréses allél viszont a *ph*<sup>410</sup> mutáció *Cbx* fenotípusának enhanszere.

keresztelés	utód ♂(db)	iab-6 <sup>-</sup> hímek	szőr/sternit átlag
<i>bon</i> <sup>P9c(L)</sup> / <i>TM6C</i> ♂ ⊗ <i>Df(3R)red trx/TM3</i> ♀	<i>bon</i> <sup>P9c(L)</sup> / <i>TM3</i> (170)	4,1 %	0,05
	<i>Df(3R)red trx/TM6C</i> (187)	7,5 %	0,11
	<i>bon</i> <sup>P9c(L)</sup> / <i>Df(3R)red trx</i> (314)	<b>27,1 %</b>	<b>0,76</b>
<i>Df(3R)red trx/TM3</i> ♂ ⊗ <i>bon</i> <sup>P9c(L)</sup> / <i>TM6C</i> ♀	<i>bon</i> <sup>P9c(L)</sup> / <i>TM3</i> (70)	0 %	0,00
	<i>Df(3R)red trx/TM6C</i> (134)	1,5 %	0,02
	<i>bon</i> <sup>P9c(L)</sup> / <i>Df(3R)red trx</i> (166)	1,2 %	0,05
<i>Bon</i> <sup>117A</sup> / <i>bon</i> <sup>117A</sup> ♂ ⊗ <i>Df(3R)red trx/TM3</i> ♀	<i>Bon</i> <sup>117A</sup> / <i>TM3</i> (285)	4,2 %	0,08
	<i>bon</i> <sup>117A</sup> / <i>Df(3R)red trx</i> (449)	<b>32,7 %</b>	<b>1,09</b>
<i>Df(3R)red trx/TM3</i> ♂ ⊗ <i>Bon</i> <sup>117A</sup> / <i>bon</i> <sup>117A</sup> ♀	<i>Bon</i> <sup>117A</sup> / <i>TM3</i> (135)	2,2 %	0,04
	<i>bon</i> <sup>117A</sup> / <i>Df(3R)red trx</i> (218)	<b>14,7 %</b>	<b>0,46</b>

### 3.3 táblázat A *bonus* és *trithorax* gének mutációinak kölcsönhatása

A harmadik oszlop adatai az iab-6<sup>-</sup> fenotípust mutató állatoknak az összes kikelt F1 állatra vonatkoztatott százalékos arányát mutatják. A negyedik oszlop adatait úgy kaptuk, hogy az iab-6<sup>-</sup> fenotípust mutató állatok hatodik sterniten megszámlált szőreinek számát összeadtuk, és elosztottuk az összes kikelt F1 állat számával. Zárójelben feltüntettük, hogy az egyes utódkategóriákból hány állatot vizsgáltunk meg.

Kísérleteink alapján azt mondhatjuk, hogy a *bon* gén a *trithorax*-csoport tagja. A *bon*<sup>117A</sup> feltehetőleg olyan antimorf *bon* allél, mely által kódolt fehérje bizonyos fehérjekomplexekben képes betölteni feladatát, másokban nem. A funkcióvesztéses allélokkal szemben nem világosítja a transzgenikus konstrukció által meghatározott szemszín, tehát a konstrukcióban található *iab-7* PRE-val való kapcsolata nem károsodott. Elképzelhető, hogy a sötétítő hatás másodlagos: valamely POLYCOMB-csoportba tartozó fehérje (vagy fehérjék) regulációjában a BON aktiváló faktorként részt vesz, és a BON<sup>117A</sup> fehérje ebben az aktiváló komplexben nem működik megfelelően. Ennek következtében az adott POLYCOMB-fehérje mennyisége csökken, ezért a transzgenikus szemszín sötétedik. Valószínűbb magyarázat azonban, hogy a BONUS fehérje szerepe a különböző, DNS-hez kötött fehérjekomplexek közötti kapcsolat fenntartása lehet (mediátor funkció a *white enhancer*, a promóter és a PRE között). Ebben az esetben a *bon*<sup>117A</sup> fenotípusa azzal magyarázható, hogy az allél által kódolt mutáns fehérje egyes komplexekben képes mediátorként működni, míg másokban nem. A BON<sup>117A</sup> fehérje a homeotikus gének szabályozásában sem látja el feladatát megfelelően, hiszen a *bon*<sup>117A</sup> allél *iab-5*<sup>-</sup> fenotípust okoz.

Mivel kísérleteink szerint a BON fehérje a kromatin aktív állapotának fenntartásában játszik fontos szerepet, megvizsgáltuk, milyen hatással van az inaktív kromatinkonformáció fenntartásának hiszton-deacetiláz gátlószer, n-butirát alkalmazásával való általános gyengítése a *bon* mutáció funkcióvesztéses fenotípusára. Kísérletünkhöz egy olyan gyenge allélkombinációt választottunk (*bon*<sup>P9c(L)</sup>/*bon*<sup>249/12</sup>), amelyet hordozó nőtények nagyon ritkán kikelnek, de jellegzetes szárnyfenotípust mutatnak, és csak rövid ideig élnek. A keresztezéseket négy különböző módon végeztük el. Az első esetben a keresztezést hagyományos módon, standard táptalajon végeztük. A második esetben a keresztezést standard táptalajon végeztük, majd a nőtényeket n-butirátot 0,05 M végkoncentrációban tartalmazó táptalajra petéztettük. A harmadik esetben a szülőket a petezés előtt 0,05 M n-

butirátot tartalmazó táptalajon tartottuk, majd ugyanilyen táptalajra petéztettük. A negyedik esetben a n-butirátot tartalmazó táptalajon tartott szülőket standard táptalajra petéztettük.

Azokban a keresztezésekben, amelyekben a szülőket a petéztetés előtt n-butirátot tartalmazó táptalajon tartottuk, a kikelő állatok között megfigyeltünk  $bon^{P9c(L)}/bon^{249/12}$  genotípusú hímekeket, míg a másik két esetben ebből az utódkategóriából csupán nőstények keltek ki. A kikelő hímek mutatják a nőstényekre is jellemző szárnyfenotípust, szemük durva, valamint változatos szőrfenotípusok figyelhető meg rajtuk.

A szülők 0,05 M koncentrációjú n-butiráttal való etetése tehát részlegesen menekíti a gyenge *bon* allélkombinációkra jellemző hímspecifikus letalitást, ami további bizonyítékul szolgál arra, hogy a BON fehérje a kromatinszerkezet aktív állapotának fenntartásában játszik fontos szerepet.

Azt, hogy a *bon* gén mutációja a hímekben súlyosabb következményekkel jár, mint a nőstényekben, Beckstead és munkatársai az Y-kromoszóma jelenlétének tulajdonítják. Kísérleteik szerint sem a szomatikus ivarmeghatározás, sem a dóziskompensációs rendszer épsége nem befolyásolja a homozigóta *bon* hímek életképességét. Véleményük szerint az Y-kromoszóma jelentős mennyiségű BON fehérjét köt le a rendelkezésre álló mennyiségből, így tulajdonképpen a *bon* fenotípusának enhanszereként viselkedik (Beckstead és mtsai, 2005).

Röntgen-reverziós kísérleteink során is számos funkcióvesztéses *bon* allélt izoláltunk sötétítő mutációk szuppresszoraiként. Az általunk izolált *bon* allélok nagy száma egyrészt arra utal, hogy a *bon* meglehetősen nagyméretű gén, (10 exon, ~35 kb), másrészt, mint kísérleteinkből is kiderült, a BON fehérje a kromatinszerkezet szintjén ható alapvető fontosságú faktor.

### 3.2.6 Egyéb, röntgen-reverzióknak alávetett mutációk (10, 10A/2, 15, 21 és 24)

A 10, 10A/2, 15, 21 és 24 jelű harmadik kromoszómás mutációk a 18.73.1 vonal szemszínét erősen sötétítik – ami a *Polycomb*-csoport génjeinek mutációira jellemző viselkedés -, azonban trithorax-jellegű homeotikus fenotípust és interakciókat is mutatnak. A kettős fenotípus alapján azt feltételeztük, hogy a fent említett mutációk funkciónyeréses jellegűek, ezért megkíséreltük ezen mutációk röntgensugárzással való reverzióját.

A reverziós kísérletek során minden esetben 15-25.000 vizsgáltunk meg az első utódgenerációban. A revertáns jelölteket a *bon*<sup>P<sup>9c</sup>(L)</sup> bonus allélhoz kereszteztük, mert korábbi kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a *bon* gén mutációi szuppresszálják a mutánsok szemszínét sötétítő hatását. Mivel a *bon* gén körülbelül 35 kilobázis hosszú, a röntgensugárzás gyakran indukál mutációkat ebben a génben.

#### 3.2.6.1 A 10 jelű mutáció

A 10 jelű mutáció erősen sötétíti a 18.73.1 transzgén által meghatározott szemszín (Polycomb-jelleg), viszont a Fab-7<sup>2</sup> fenotípus szuppresszora (trithorax-jelleg). A mutáció a *w*<sup>m4h</sup> mutációval adott kölcsönhatása alapján a PEV szuppresszora. Ezen eredmények alapján azt feltételeztük, hogy a 10 jelű mutáció által meghatározott gén terméke alapvető feladatot lát el a kromatinszerkezet kialakításában. A 10 jelű mutáció nincs hatással az *Mcp* PRE-t tartalmazó konstrukciókra, tehát a 10 jelű mutáció által kijelölt fehérje minden bizonnyal specifikus az *iab-7* PRE szakaszra.

A kettős fenotípus miatt (szemszín sötétítő hatás és trithorax-jellegű viselkedés) megkíséreltük a 10 jelű mutáció röntgensugárzással való reverzióját. A reverzió nem járt sikerrel, a kísérlet során csupán szuppresszorokat (főképpen *bon* allélokat, lásd 3.2.5 fejezet) sikerült izolálnunk.



### 3.2.6.2 A 10A/2 jelű mutáció

A 10A/2 jelű mutáció iab-6<sup>-</sup> fenotípust mutat (trithorax-jelleg), azonban a *Fab-7<sup>2</sup>* mutáció gyenge, klónos jellegű enhanszere (Polycomb-jelleg). A mutáció röntgensugárzással nem bizonyult revertálhatónak, csupán szuppresszorokat nyertünk a reverziós kísérlet során.

A 10A/2 mutáció által kijelölt gént – a mutáció szemszínét sötétítő hatását, és egy jellegzetes domináns fenotípusát (humerális szőrhiány) kihasználva - a *curled* (86D3-86D4) és a *stripe* (90E4-90F1) recesszív markerek közé térképeztük.

### 3.2.6.3 A 15 jelű mutáció

A 15 jelű mutáció homozigóta életképes. A heterozigóta állatok iab-5<sup>-</sup> fenotípust mutatnak, ez a jelleg a homozigóta állapotban kis mértékben erősödik. A mutáció heterozigóta formában a *Fab-7<sup>2</sup>* mutáció gyenge szuppresszora.

A reverziós kísérlet során három valódi revertáns vonalat sikerült izolálnunk. A három vonal közül kettőben (*15<sup>R3/3</sup>* és *15<sup>R6/2</sup>*) a 15 jelű mutáció teljes reverziója figyelhető meg: ezek a revertánsok nem mutatják a 15 jelű mutációra jellemző iab-5<sup>-</sup> fenotípust, és szemszínük sem sötétebb a 18.73.1 vonal szemszínénél. A *15<sup>R3/3</sup>* a *Fab-7<sup>2</sup>* mutáció gyenge enhanszereként viselkedik, a *15<sup>R6/2</sup>* pedig Mcp fenotípust mutat, ami arra utal, hogy a 15 jelű mutáció által kijelölt gén a *Polycomb*-csoport tagja. Homozigóta formában mindkét revertáns letális.

Izoláltuk a 15 jelű mutáció egy részleges revertánsát is. A *15<sup>R15/1</sup>* jelű revertáns vonal szemszíne sötétebb, mint a 18.73.1 által kialakított szemszín, de világosabb, mint az eredeti 15 jelű törzs szemszíne. A revertáns vonal homozigóta életképes, a homozigóták szemszíne sötétebb a heterozigótáknál. A 15 jelű vonallal visszakeresztelve a transzheterozigóta állatok szeme világos, és nem mutatják a 15 jelű vonalra jellemző iab-5<sup>-</sup> fenotípust.

### 3.2.6.4 A 21 jelű mutáció

A 21 jelű mutáció a szemszínsötétítő hatás mellett mind  $iab-5^-$ , mind  $iab-6^-$  fenotípust mutat.

A reverziós kísérlet során kiválasztott több, mint 80 jelölből egy sem bizonyult valódi revertánsnak, azonban a *bon* gén újabb alléljait izoláltuk, mint domináns szuppresszorokat.

A 21 jelű mutáció által kijelölt gént az *ebony* markergén közelébe, az *ebony* (93C7-93D1) és a *claret* (99C2-99C2) recesszív markerek közé térképeztük.

### 3.2.6.5 A 24 jelű mutáció

A 24 jelű mutáció erősen sötétíti a *18.73.1* vonalra jellemző szemszínt (Polycomb-jelleg), de emellett  $iab-5^-$  és  $iab-6^-$  fenotípust mutat (trithorax-jelleg). A 24 jelű mutáció a *Fab-7<sup>2</sup>* mutációnak is erős szuppresszora.

A reverziós kísérlet során három jelölt vonalat állítottunk be. A  $24^{R26}$  és  $24^{R2.4A/1}$  jelöltek mind homozigóta formában, mind a 24 jelű mutációval transzheterozigóta állapotban letálisak. A  $24^{R2.4A/1}$  revertáns vonal  $iab-5^-$  fenotípusa gyengébb, mint az eredeti 24 jelű mutációé.

A harmadik jelölt, a  $24^{R2.19}$  szeme mozaikos (az alapszín a *18.73.1* vonal szemszínéhez hasonló, de a szem világosabb facettákat is tartalmaz). A  $24^{R2.19}$  nem mutatja a 24 jelű mutációra jellemző  $iab-5^-$  és  $iab-6^-$  fenotípust. Meglepő módon a  $24/24^{R2.19}$  transzheterozigóta állatok életképesek, szemük világos, azonban  $iab-5^-$  fenotípust mutatnak. Szemben a 24 jelű mutációval a  $24^{R2.19}$  a *Fab-7<sup>2</sup>* mutációt nem szuppresszálja. Mivel gyanakodtunk, hogy jelöltünk nem valódi revertáns, csupán a 24 jelű mutáció szuppresszora, megkíséreltük rekombinációval eltávolítani az eredeti mutációtól. A rekombinációs kísérlet sikerrel járt, egyben megállapítottuk, hogy az említett szuppresszor a 24-es jelű mutáció által kijelölt géntől körülbelül 23,89 cM-re helyezkedik el.

A 24 jelű mutációt a *thread* (72D1-72D1) és *curled* (86D3-D4) recesszív markerek közé térképeztük.

### 3.2.7 *msl* (*male-specific lethal*) mutációk

Azonosítottunk olyan sötétítő mutációkat, melyek csak a hím állatok szemszínére vannak hatással, a mutációt hordozó nőtények szemszíne változatlan marad. Ezek a mutációk hím állatokban homozigóta formában letálisak.

Régebből ismert öt hím-specifikus letális gén, melyek termékei kromoszómális proteinek. Ezek a fehérjék a hím állat X-kromoszómájához kötnek, fontos szerepük van a dóziskompensációban: a hímek X-kromoszómájáról történő transzkripció a nőtény X-kromoszóma transzkripciójánál kétszer intenzívebb (Scott és mtsai, 2000).

A *white enhancer*-t és *miniwhite* riportergént tartalmazó konstrukciókon ektopikus dóziskompensáció érvényesül: a hímek szemszíne a nőtényekénél erősebb. Ez lehet az oka annak, hogy kísérletünk során ilyen jellegű mutációkat is izoláltunk. Laborunkban Ardó László hasonló módszerrel azonosította az *msl-1* új mutáns allélját.

További vizsgálatok szükségesek annak eldöntéséhez, hogy van-e valamilyen közvetlen kapcsolat a POLYCOMB- illetve TRITHORAX-fehérjék és a hím-specifikus letális gének által kódolt fehérjék között.

## 3.3 Új transzgenikus konstrukciók létrehozása

Korábbi kísérleteink valószínűsítik, hogy a *Fab-7* régió MvaI-HindIII (~1200 bp) fragmentje tartalmaz egy TRE-t is a központi PRE-n kívül eső szakaszok valamelyikén (az ApaI-XbaI fragmenten kívül eső szakaszon). Hogy további kísérleteinkben az egyes mutációk által kijelölt fehérjék támadáspontját pontosabban térképezni tudjuk, új transzgenikus konstrukciók elkészítése vált szükségessé.

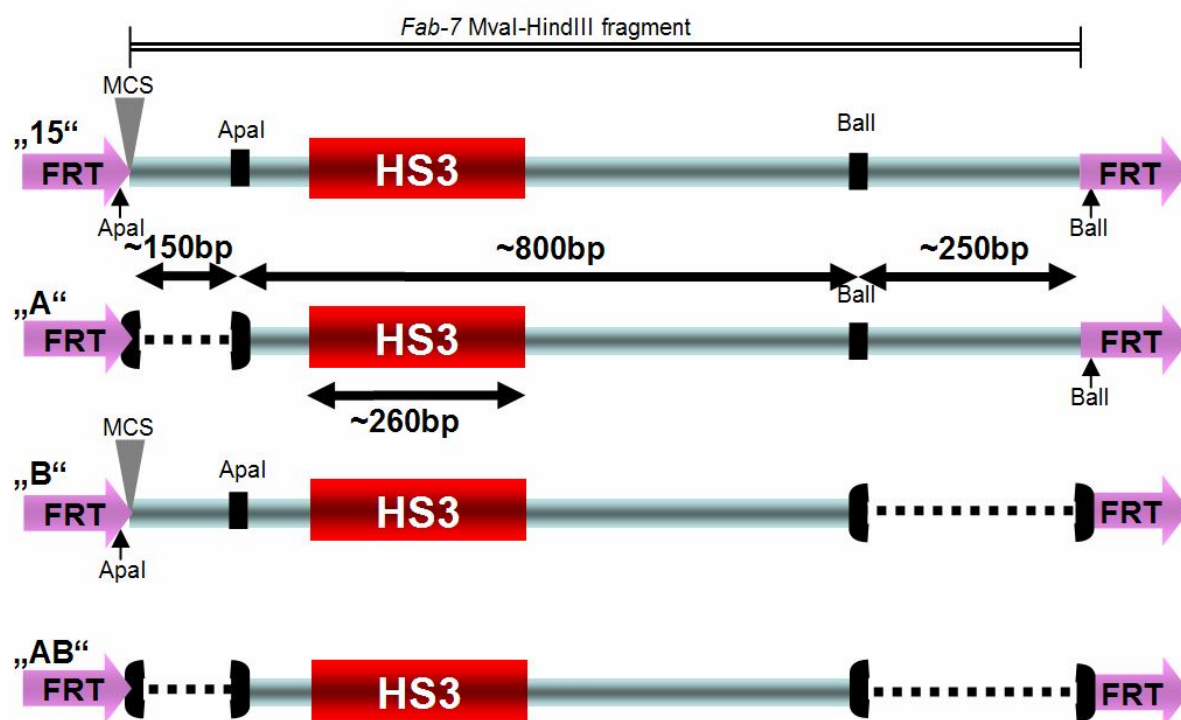
A különböző transzgenikus konstrukciókkal végzett kísérleteink tanulsága szerint egyes mutációk szemszint befolyásoló hatása kizárólag akkor érvényesül, ha az *iab-7* PRE közelében megtalálható a riportergén enhanszere is (ld. *bon*). Ezen mutációk által érintett fehérjék egy része valószínűleg nem tartozik az *iab-7* PRE-n *in vivo* felépülő fehérjekomplex tagjai közé. A riportergén enhanszere és az *iab-7* PRE közötti együttműködés jelensége ronthatja a mutánsizolálási kísérletek specificitását. Ezért fontos volt, hogy a készítendő transzgenikus konstrukcióink ne tartalmazzák a *white enhancer*-t.

Olyan konstrukciókat terveztünk, amelyek lehetővé teszik a konstrukcióban található *iab-7* PRE izolációját az inszerciós hely közelében található endogén PRE-ktől. Ez különösen azért fontos, mert az *iab-7* PRE-t tartalmazó konstrukciók nagy gyakorisággal épülnek be endogén PRE-k közelébe. Az endogén PRE szakaszokkal való interakció kiküszöbölése azért elsődlegesen fontos, hogy vizsgálni tudjuk az egyes mutációknak tisztán az *iab-7* PRE-ra gyakorolt hatását.

Ennek megfelelően négy konstrukciót kellett készítenünk: egyet, mely csak a központi ApaI-Ball („AB”) szakaszt tartalmazza, egyet, mely a teljes MvaI-HindIII („15”) szakaszt magában foglalja, illetve egyet-egyet, melyek a központi szakaszon kívül csak az egyik, illetve másik oldali szakaszt tartalmazzák (ApaI-HindIII („A”), illetve MvaI-Ball („B”)) (**3.6 ábra**).

Az egyes PRE fragmenteket FRT (Flip Recombinase Target) szekvenciák közé klónoztuk, így lehetővé téve, hogy azokat a transzformáns vonalakból FLIP RECOMBINASE segítségével eltávolíthassuk. Ha a heterozigóta transzformáns vonal szemszíne a PRE eltávolítása után nem változik, akkor feltételezhetjük, hogy a transzgenikus konstrukcióban lévő PRE nem működik együtt a környezetében található endogén PRE-kkal. Ilyen esetekben valószínűsíthető, hogy kizárólag a homológ kromoszómákon lévő azonos inszerciók közötti kölcsönhatást vizsgáljuk.

A konstrukciók elkészítése után azokat CaSpeR vektorba átklónoztuk, majd *white* embriókba injektáltuk. A fehértől eltérő szemszínű állatok felhasználásával – a konstrukció kromoszómára térképezése után – törzseket alapítottunk.



**3.6 ábra** Az általunk készített FRT::*iab-7* PRE::FRT::*miniwhite* transzgenikus konstrukciók felépítése

A „HS3” feliratú piros négyzet a minimál PRE funkcióval rendelkező nukleáz-hiperszenzitív szakaszt jelöli. Pontozott vonal jelöli a *Fab-7* régió azon szakaszait, amelyek az egyes konstrukciókból hiányoznak. Az „FRT” feliratú nyíl iránya megfelel az FRT szekvencia irányultságának.

A legnagyobb „15” jelű transzgenikus konstrukcióból 14, az „A” konstrukcióból 12, míg a „B” és „AB” konstrukciókból 1-1 törzset állítottunk be (3.4 táblázat).

konstrukció	letális vonalak	nem párosodás- érzékeny vonalak (NPS)	párosodás-érzékeny vonalak (PS)
„15”	4 (3.kr)	3 (2.kr), 3 (3.kr)	4 (3.kr)
„A”	2 (3.kr)	1 (2.kr), 4 (3.kr)	3 (2.kr), 2 (3.kr)
„B”	-	-	1 (2.kr)
„AB”	-	-	1 (2.kr)

**3.4 táblázat Az elkészített FRT::*iab-7* PRE::FRT::miniwhite transzgenikus konstrukciók injektálásával nyert vonalak**

A kapott vonalak száma mögött zárójelben az integráció helye (2. kromoszóma, illetve 3. kromoszóma) látható.

A *trx*, az *ash1* és az  $E(z)^{Trm}$  mutációk transzgenikus szemszínre gyakorolt világosító hatása alapján a régióban található TRE a *BalI* és *HindIII* enzimek hasítóhelyei által határolt - körülbelül 250 bp hosszúságú - szakaszon belülre térképezhető (Bajusz Izabella személyes közlése).

A beállított törzsek felhasználásával - illetve ezekből kiindulva újabb inszerciók létrehozása után - tesztelni kívánjuk a *Polycomb*- és a *trithorax*-csoportba tartozó ismert és eddig ismeretlen gének mutációinak hatását az *iab-7* PRE különböző szakaszain.

#### 4 AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Kísérleteink során egy speciális, érzékenyített rendszert használtunk arra, hogy a *bithorax*-komplex eddig ismeretlen regulátor faktorait izoláljuk. Két különböző mutagén ágenssel (EMS-sel és röntgen besugárzással) mutagenézis kísérletet hajtottunk végre két különböző transzgenikus konstrukciót (18.73.1 és 102.103.2) hordozó ecetmuslica vonalon. Olyan transzgéneket használtunk, melyekben a riportergén párosodás-érzékeny módon represszálódik a konstruktban lévő, szomszédos silencer (*iab-7* PRE) hatására. Mivel sem a 18.73.1, sem a 102.103.2 jelű transzgén az *iab-7* PRE szakaszon kívül nem hordoz a *bithorax*-komplexből származó semmilyen más szekvenciát, lehetővé vált olyan gének azonosítása is, melyek termékei ezen a PRE szakaszon kialakuló speciális represszor komplex komponensei.

Kísérleteink során olyan mutációkat izoláltunk, amelyek a homozigóta riportergén kifejeződését erősítik, illetve gyengítik. Úgy találtuk, hogy az általunk használt transzgének különösen érzékenyek két korábban ismert gén (*Scm* és *Pcl*) és két korábban ismeretlen, általunk azonosított és elnevezett gén (*Pis* és *Fes*) mutációira.

Kísérleti rendszerünk hatékonyságát bizonyítja, hogy több olyan gén mutációját is izoláltuk, melyek a *Polycomb*- illetve a *trithorax*-csoport ismert tagjai (*Scm*, *Su(Pc)37D*, *Pcl*, *Psc*, *Su(z)2*, *vtd*, *Su(z)12*). Ezen kívül izoláltuk számos - eddig ismeretlen - gén mutációját, melyek a transzgenikus szemszint sötétítik, illetve világosítják. Fenotípusuk alapján feltételezhető, hogy ezek a mutációk a *Polycomb*- illetve a *trithorax*-csoport korábban ismeretlen tagjainak génjeit képviselik. Az új mutánsok egy része szuppresszora vagy enhanszere a Fab-7<sup>1</sup> illetve a Fab-7<sup>2</sup> fenotípusnak, tehát minden bizonnyal fontos szerepet játszanak a *bithorax*-komplex *cis*-regulátorainak aktív és inaktív konformációjának fenntartásában.

Több EMS-indukált allél esetében röntgen-reverziót kíséreltünk meg, amely két mutáció esetében (*bon*<sup>117A</sup>, *gpp*<sup>94A</sup>) hozzásegített a mutációt hordozó gén azonosításához. A *gpp* gén általunk azonosított röntgen-indukált alléljai segítettek a gén klónozásában. A *bon* gén általunk azonosított funkciónyeréses (sötétítő) és funkcióvesztéses (világosító) alléljai, valamint a génben található egyik P-elem remobilizációjával előállított további független funkcióvesztéses allélok vizsgálatával közelebb jutottunk a BON fehérje kromatinszerkezetben betöltött szerepének megismeréséhez. Kísérleteink során kiderült, hogy a BON fehérje a kromatinszerkezet szintjén ható alapvető fontosságú faktor, melynek valószínűleg az aktivációban van szerepe.

Izoláltunk egy pozíció effektus variegációt befolyásoló mutációt is (*10*), mely szintén fontos szerepet játszhat a kromatinszerkezet aktív, illetve inaktív állapotának fenntartásában.

Megtaláltuk a *trithorax*-csoport egy új tagjának génjét (*Fes*). A gén mutációja a transzgenikus szemszín erőteljes világosodását okozza, valamint erősen szuppresszálja a Fab-7<sup>2</sup> fenotípust. A továbbiakban a gén citológiai térképezését tervezzük.

Izoláltuk a *Polycomb*-csoport egy új tagjának génjét (*Pis*) is. A *Pis* gén fehérjeterméke (DSFMBT) a PHORC komplex tagjaként fontos szerepet játszik az *iab-7* PRE szakaszon kialakuló represszióban.

A transzgenikus konstrukcióban található autonóm dóziskompensációval rendelkező *miniwhite* riportergénnek köszönhetően izoláltunk olyan hím-specifikus letális mutációkat, melyek által meghatározott gének fehérjetermékeinek fontos szerepe lehet az *ecetmuslica* dóziskompensációs folyamataiban.

Kísérleteinkből kiderül, hogy egyes fehérjék nem szükségesek az *iab-7* PRE működéséhez, míg mások fontos szerepet töltenek be az adott PRE szakaszon. Izoláltunk az *iab-7* PRE szakaszra specifikus hatású mutációkat is. Bebizonyítottuk, hogy az *iab-7* PRE és TRE funkció szorosan összekapcsolódik. Kísérleteink számos példával szolgálnak arra, hogy



a *Polycomb*- illetve a *trithorax*-csoport tagjai finoman szabályozott regulációs hálózatot alkotnak.

Létrehoztunk olyan konstrukciókat, amelyek az *iab-7* PRE egyes kisebb szakaszait tartalmazzák. Ezeket a konstrukciókat úgy készítettük el, hogy a konstrukcióban lévő PRE szakaszt FRT szekvenciák közé klónoztuk, hogy vizsgálni tudjuk az adott szakasz genomikus PRE szakaszoktól való függetlenségét. Ezen konstrukciók segítségével kívánjuk térképezni a *Polycomb*- és a *trithorax*-csoport egyes tagjainak támadáspontját a tágabban értelmezett PRE szakaszon belül.

Terveink között szerepel az általunk azonosított gének további genetikai jellemzése, térképezése, a funkcionyeréses allélok revertálása, a pontosan ismert lokalizációjú gének klónozása és a fehérjetermékük funkciójának megállapítása. Szeretnénk megismerni az egyes *cisz*-regulátorokon kialakuló represszáló komplexek tagjainak funkcióját, a komplexek struktúráját, a kromatinkonformáció aktív-inaktív állapotának felismerési és fenntartási módját.

Reményeink szerint kísérleteink hozzájárulnak az *iab-7* PRE szakaszon ható faktorok megismeréséhez, illetve az itt kialakuló POLYCOMB-fehérjekomplex működésének pontosabb megértéséhez.

## 5 AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Az eddigi mutánsizolálási rendszereket a *Polycomb*-, illetve *trithorax*-génnek mutációi által okozott homeotikus fenotípusokra, illetve az egyes mutációk közötti genetikai interakciókra alapozták. Kísérleteink során egy merőben új módszert használtunk eddig ismeretlen *Polycomb*- és *trithorax*-génnek azonosítására.

Az izolált PRE szakaszt tartalmazó transzgenikus konstrukciók (Hagström és mtsai, 1997) fő előnyei az érzékenység és a specificitás. A módszer érzékenységére utal, hogy ezen konstrukciók segítségével olyan mutációkat is sikerült azonosítanunk, melyek nem mutatnak homeotikus fenotípust, és nem lettek volna azonosíthatók a *Fab-7<sup>2</sup>* mutáció fenotípusára gyakorolt hatásuk alapján sem. A specificitást az jelenti, hogy a transzgenikus konstrukcióban izolálni tudjuk a vizsgálni kívánt PRE szakaszt a környező genomikus szekvenciáktól, így elvileg a screen során csak ténylegesen az adott DNS szakaszon ható fehérjék génjeit azonosítjuk.

Az alkalmazott módszer összességében beváltotta a hozzá fűzött reményeket: mind EMS-, mind röntgen-mutagenézis segítségével sikeresen izoláltunk számos olyan mutációt, mely a transzgenikus állatok szemszínét sötétíti, illetve világosítja, az ezen mutációk által kijelölt gének tehát nagy valószínűséggel a *Polycomb*-, illetve *trithorax*-csoport tagjai. A módszer meglehetősen hatékonynak bizonyult, hiszen a *Polycomb*-, illetve a *trithorax*-csoport olyan, korábban ismeretlen tagjainak azonosítása is lehetővé vált, amelyeket a korábbi nagy egyedszámmal végrehajtott mutagenézis kísérletekben nem sikerült azonosítani. A kis mértékű szemszínváltozást okozó (domináns homeotikus fenotípust nem mutató) mutációk is könnyen izolálhatók és kezelhetők a transzgenikus konstrukciók hátterében.

Habár mutánsizolálási kísérleteink igen nagy léptékűek voltak, és számos génnek – mind ismerteknek (*Scm*, *Pcl*, *Su(z)12*, *bon*, *vtd*), mind korábban ismeretleneknek (*Pis*, *Fes*,

*gpp*) - több allélját is sikerült azonosítanunk, mégsem sikerült telítést elérnünk. Erre utal, hogy 80-nál is több olyan új mutációt izoláltunk, melyek mind önálló komplementációs csoportot alkotnak, valamint az is, hogy habár az *Scm<sup>DI</sup>* mutáció erősen sötétíti mindkét vonal szemszínét, a 102.103.2 konstrukció háttérében mégsem sikerült egyetlen *Scm* allélt sem azonosítanunk. Az új mutációk igen nagy száma – mely jóval túlmutat Jürgens (1985) becslésén a *Polycomb*-csoport tagjainak számát illetően -, arra enged következtetni, hogy a PRE/TRE-szakaszokat tartalmazó transzgenikus konstrukciók háttérében végzett mutagenézis kísérletek a jövőben is hasznos eszköznek bizonyulhatnak a *Polycomb*- és a *trithorax*-csoport tagjainak izolálásához. Az izolált mutációk által kijelölt gének nagy száma ugyanakkor arra utal, hogy egy hatalmas méretű screen sem elegendő ahhoz, hogy kísérleteink a *Polycomb*- és *trithorax*-csoport egyes eddig ismeretlen tagjait kellő számban prezentálják.

Természetesen a transzgenikus konstrukciók alkalmazásának is vannak hátrányai. A mutagenézis kísérlet során több alkalommal is izoláltunk olyan szemszínt sötétítő és világosító mutációkat, melyek valójában magát a transzgenikus konstrukciót érintették. A riportergént, vagy enhanszerének működését elrontó mutációkat világosítókként izoláltuk, mivel ezek csökkentik a *miniwhite* expressziós szintjét. A transzgenikus konstrukció által kialakított szemszínt sötétítő mutációk vagy a PRE szakaszt érintik, vagy az egész konstrukciót eltávolítják a genomból, megakadályozva a párosodás-függő gátlás kialakulását. Előfordultak olyan sötét szemű állatok is, melyekben nem maga a konstrukció szenvedett károsodást, hanem a homológ kromoszómákon lévő transzgének párosodása vált lehetetlenné valamilyen kromoszómaszerkezeti változás következtében. Szerencsére ezek a számunkra érdektelen mutációk genetikai módszerekkel könnyen kiszűrhetők. A PRE szakaszt érintő mutációkat törzsbe állítottuk, arra számítva, hogy a jövőben ezen mutáns PRE szakaszok szekvenálásával esetleg felderíthetjük a POLYCOMB-, illetve a TRITHORAX-csoport fehérjéinek kötődéséhez szükséges - eddig ismeretlen funkciójú - szekvenciákat.

Kísérleteinkben két különböző transzgenikus konstrukciót használtunk. Az *iab-7* PRE hosszabb szakaszát hordozó transzgenikus konstrukció felhasználásával (18.73.1) EMS-indukált, míg a minimál PRE-t tartalmazó konstrukció (102.103.2) felhasználásával röntgen-indukált mutagenézis kísérletet végeztünk. A mutagén ágens megválasztásánál elsősorban azt vettük figyelembe, hogy míg az EMS funkciónyeréses mutációkat is okozhat, a röntgensugárzás zömében csupán funkcióvesztéses mutációkat indukál. A mutagenézis kísérleteink eredményei megfeleltek ennek az elképzelésnek. Az EMS által indukált mutációk közül kettő (*bon*<sup>117A</sup>, *gpp*<sup>94A</sup>) is funkciónyerésesnek bizonyult, ezeket röntgensugárzás segítségével revertálni tudtuk. A röntgensugárzás által indukált mutációkkal kapcsolatban nem áll rendelkezésünkre ilyen jellegű információ, de egyes megfigyeléseink arra utalnak, hogy a röntgensugárzás indukált mutagenézis során is izoláltunk funkciónyeréses allélokat (például a *Fes* egyes alléljait).

Egyes funkcióvesztéses mutánsaink (*Su(Pc)37D*, *vtd*, *Psc*) a várttal ellentétes szemszínváltozást okoznak a PRE-t tartalmazó transzgenikus konstrukciók hátterében. Ez a jelenség több különböző elmélettel magyarázható.

Az egyik magyarázat arra a megfigyelésre épül, hogy a POLYCOMB- és a TRITHORAX-csoport fehérjéi nem állnak messze egymástól szerkezetileg, nem ritkán egymással homológ doméneket is tartalmaznak, illetve az egyik csoport génjeinek egyes funkciónyeréses mutáns fenotípusai a másik csoport génjeinek funkcióvesztéses mutáns fenotípusaira hasonlíthatnak (Bajusz és mtsai, 2001). Előfordul olyan eset is, hogy egyes gének mutációi bizonyos fenotípusokat tekintve *Polycomb*-csoportba, más fenotípusokat tekintve a *trithorax*-csoportba sorolhatók (például a *gpp*; Shanower és mtsai, 2005). Ezért egyes kutatók felvetették, hogy a kromatinkonformáció kialakításában szerepet játszó géneknek van egy átfedő csoportja, az EPT- (Enhancer of Polycomb and Trithorax) csoport (Brock és van Lohuizen, 2001). Ezen géncsoport tagjainak szerepe lehet mind a nyílt, mind a zárt kromatinkonformáció

kialakításában. Az EPT-csoportba tartozó gének mutációi tehát a *cis*-regulátoroknak mind az aktív, mind az inaktív állapotának biztosításához szükségesek, így magyarázható az egyes esetekben kapott kettős (például a szemszín tekintve Polycomb-jellegű /sötétítő/, míg a homeotikus fenotípust tekintve trithorax-jellegű) fenotípus.

A kísérleteink során tett megfigyelések azonban inkább a fent említett jelenség egy másik lehetséges magyarázatát valószínűsítik. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a *Polycomb*-, illetve a *trithorax*-csoport tagjai egy nagyon érzékeny, finoman szabályozható rendszer komponensei, amelyek gyakran kölcsönösen szabályozzák egymás kifejeződését, vagy működését. Ezt még inkább alátámasztja az az észrevételünk, hogy minden általunk izolált *Psc* allél világosítja a transzgenikus konstrukció által kialakított szemszín, míg az ismerten a *Psc* transzkripció szabályozása alatt álló *Su(z)2* (Wu és Howe, 1994) általunk izolált allélja sötétíti azt.

Nem kizárható, hogy egyes esetekben egy transzkripció szabályozástól független ok áll a várttal ellentétes szemszín kialakulásának hátterében. Bizonyos esetekben TRITHORAX-csoportba tartozó fehérjék szükségesek a POLYCOMB-gátlás kialakulásához. Hasonlóan a GAGA-faktorhoz, egyes nukleoszóma-remodelling komplexek tagjai részt vehetnek azoknak a nukleáz hiperszenzitív kromatin szakaszoknak a kialakításában, melyek a PCG fehérjék támadáspontjául szolgálhatnak. Az ilyen faktorok gyengítik a transzgenikus konstrukcióban lévő riporter génen kialakuló gátlást, de mutációjuk ettől függetlenül okozhat trithorax-jellegű homeotikus fenotípust.

A trithorax-jellegű homeotikus fenotípusuk alapján várttal ellentétes szemszínváltozást okozó (sötétítő) mutációk közül többet is reverziós mutagenézis kísérletnek vetettünk alá. Ezek közül egyeseket sikerült revertálni is. Így bizonyosodott be, hogy az általunk izolált 94A mutáció a *gpp*, míg a 117A a *bon* gén allélja. A funkciónyeréses és a funkcióvesztéses fenotípusok összehasonlítása sok információt nyújt ezen gének fehérjetermékeinek

működéséről. Míg a funkcióvesztéses *bon* allélok a transzgenikus szemszín erősen világosítják, a *gpp* funkcióvesztéses alléljainak nincs világosító hatásuk. Valószínűleg mindkét gén fehérjeterméke közvetlenül hat az *iab-7* PRE-n, azonban a *gpp* másodlagos hatása (Polycomb-enhanszer) közömbösíti a PRE-n okozott elsődleges világosító hatást. A BON fehérje szerepe a kromatin konformációjának kialakításában máig nem tisztázott. Irodalmi adatok szerint a *bon* mutációk egyes lókuszok esetében (*white*) PEV enhanszerekként, míg más lókuszokban (*yellow*) PEV szuppresszorokként viselkedhetnek (Beckstead és mtsai, 2005). A *bon* és a *gpp* funkciónyeréses mutánsain kívül még 5 másik mutáció esetében kíséreltünk meg reverziót, de ez csak két esetben sikerült (15 és 24).

Több PRE esetében a TRE-val való szoros kapcsolatot bizonyították (Tillib és mtsai, 1999), azonban az *iab-7* PRE ilyen tulajdonságára nincs adat. Az a tény, hogy egyes *trithorax*-csoportba tartozó gének mutációi is hatással vannak a transzgén által meghatározott szemszínre (*Fes*), azt sejteti, hogy a konstrukciókban lévő PRE szakasz tartalmaz egy TRE-jellegű szekvenciát (FRE: *Fes* *R*esponse *E*lement) is. Ez a DNS szakasz azonban nem hasonlít az eddig megismert TRE-kra, mivel a *trx* gén mutációi nem hatnak sem a *102.103.2*, sem a *18.73.1* transzgenikus konstrukciók által kialakított szemszínre. Mivel a *Fes* gén alléljait a csupán minimál PRE-t tartalmazó *102.103.2* konstrukció háttérében is izoláltuk, nagyon valószínű, hogy az említett FRE-szekvencia átfed a PRE-val, vagy annak része. Az sem kizárható viszont – különösen a *Fes* allélok furcsa komplementációs viselkedése tükrében –, hogy az összes általunk izolált *Fes* allél funkciónyeréses. Könnyen elképzelhető, hogy a mutáns FES fehérje antimorfként viselkedik az *iab-7* PRE szakaszon felépülő komplexben. Lehetséges, hogy az antimorf FES fehérje képes beépülni a fehérjekomplexbe, de ott nem tudja ellátni antirepresszor feladatát.

Kísérleteinkből kiderül, hogy nincs szükség minden POLYCOMB-fehérjére ahhoz, hogy egy adott PRE-n inaktiváló komplex épüljön fel. A *Pc* gén mutációi például nem

befolyásolják az *iab-7* PRE szakaszt tartalmazó konstrukciót hordozó állatok szemszínét. Az *E(z)* gén funkcióvesztéses alléljai sem sötétítik az *iab-7* PRE szakaszt tartalmazó konstrukciót hordozó vonalak szemszínét számottevő mértékben. Bár tudjuk, hogy a *bithorax*-komplexben *in situ* mindkét gén termékének szerepe van az *iab-7* PRE gátlásának kialakításában, valószínűleg nem a konstrukcióink által hordozott DNS szakaszokon hatnak. A PC fehérjének valószínűleg nem a párosodó PRE szakaszok interakciójában van fontos szerepe, hanem az elsődleges PRE szakaszok és a másodlagos, PRE-jellegű DNS szakaszok közötti kapcsolat kialakításában.

Amikor úgy döntöttünk, hogy az *iab-7* PRE szakasz két különböző méretű fragmentjét tartalmazó transzgenikus konstrukcióval végzünk hasonló léptékű mutagenézis kísérletet, arra számítottunk, hogy a két konstrukció segítségével azonosított gének tekintetében különbséget fogunk találni annak megfelelően, hogy az adott gének fehérjeterméke az *iab-7* PRE melyik szakaszán hat. Feltételezésünk beigazolódni látszik: míg a *18.73.1* konstrukció háttérében azonosítottuk a *Su(Pc)37D* és a *Su(z)2* gének egy-egy allélját, ezeket a géneket nem azonosítottuk a *102.103.2* konstrukció háttérében. Meglepő, hogy habár 15 *Scm* allélt azonosítottunk a *18.73.1* konstrukciót hordozó vonalon végzett mutagenézis kísérletben, addig a *102.103.2* konstrukció háttérében egyet sem.

Érdekes, hogy egyes gének (*vtd*, *kto2*, *Su(z)12*) mutációit csak a kisebb, minimál PRE szakaszt tartalmazó *102.103.2* konstrukció segítségével tudtuk azonosítani. A *vtd* gén hatása a transzgenikus konstrukcióra azonban nem közvetlen (*trithorax*-csoportba tartozó gén allélja szemszínsötétítő hatással). Egy lehetséges magyarázat, hogy a *vtd* gén fehérjeterméke közvetlenül is hat a *18.73.1* konstrukcióban található nagyobb PRE szakaszon, a mutációja által okozott világosító hatást azonban a minimál PRE-n érvényesülő másodlagos sötétítő hatás kompenzálja. Ez könnyen elképzelhető abban az esetben, ha a *18.73.1* konstrukció tartalmaz egy TRE-jellegű szekvenciát, mely a *102.103.2* konstrukcióban nem található meg.

Előfordulhat azonban az is, hogy az általunk azonosított *vtd* allél különleges viselkedésű, vagy egyszerűen a mutánsizolálási kísérleteink telítetlensége miatt nem azonosítottuk ezen gén mutációit a 18.73.1 konstrukció segítségével.

Izoláltunk olyan mutációkat is, melyek nem hatnak az *Mcp* PRE szakaszt tartalmazó konstrukciókra (pl. a *Fes* és a 10 jelű mutáció), de hatnak más, *iab-7* PRE szekvenciát hordozó transz génekre. Ezen gének által meghatározott fehérjék minden bizonnyal specifikusak az *iab-7* PRE működése szempontjából.

Az általunk használt transzgenikus konstrukciókban található *miniwhite* riportergénen érvényesülő autonóm dóziskompensáció jelensége miatt kísérleteinkben izoláltuk hím-specifikus letális gének alléljait is. Bár ecetmuslicában ezidáig nem ismert, hogy a PCG vagy a TRXG fehérjéi szerepet játszanak-e a dóziskompensációban, egérben mind az MPRC1, mind az MPRC2 komplex esetében bizonyították, hogy szerepet játszanak az X-kromoszóma inaktiválásban (Plath és mtsai, 2004; Schoeftner és mtsai 2006; Zhao és mtsai, 2008). Megjegyzendő ugyanakkor, hogy a *Drosophila* dóziskompensációs mechanizmusa nagyban eltér az egérben zajló folyamatoktól.

Távolabbi céljaink között szerepel az *iab-7* PRE régió funkcionális szempontból való finomtérképezése. Ebben a munkában is segítséget nyújthatnak a *Polycomb*- és a *trithorax*-csoport általunk izolált tagjai. Ha megvizsgáljuk a rendelkezésre álló mutációk különböző hosszúságú PRE szakaszt tartalmazó transzgenikus konstrukciókra gyakorolt hatását, képet kaphatunk arról, hogy a POLYCOMB-, illetve a TRITHORAX-csoport egyes tagjai az *iab-7* PRE régió mely szakaszain fejtik ki hatásukat. Így nem csupán a korábbi kísérleteink által valószínűsített közeli TRE-szekvencia pozíciója állapítható meg, de a régió más fontos egységei (például FRE szekvenciák, másodlagos PRE-k) is térképezhetővé válnak. Az így nyert adatok sokkal jobban tükrözik az egyes DNS szakaszok *in vivo* funkcióját, mint az egyes fehérjék régióon belüli kötőhelyeinek feltérképezése. A cél érdekében létrehozott



konstrukcióink az *iab-7* PRE különböző hosszúságú fragmentjeit tartalmazzák. A konstrukciók elkészítésekor figyelembe vettük a korábban használt transzgének hibáit. Tapasztalataink szerint a *white enhancer* interferálhat a konstrukciókban található PRE funkciójával, ezért az általunk készített konstrukciókba nem klónoztuk be ezt az enhanszert. Az FRT szekvenciák alkalmazása lehetővé teszi, hogy kisselektálhassuk azokat a beépüléseket, melyek esetében a transzgenikus konstrukcióban található PRE kölcsönhatásba lép valamely genomikus PRE-val.

Az eddigi eredmények alapján az elkészített konstrukciók beváltották a hozzájuk fűzött reményeket; lehetővé vált a szűkebben értelmezett TRE pozíciójának térképezése. (Bajusz Izabella személyes közlése). Reményeink szerint az *iab-7* PRE egyes izolált szakaszaival végzett kísérletek hozzájárulnak az *iab-7* PRE felépítésének és működésének pontosabb megismeréséhez.

**KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Doktori dolgozatom befejezésekor hálásan mondok köszönetet mindazoknak, akik segítettek, bátorítottak, bíztak bennem és megteremtették a feltételeket ahhoz, hogy elvégezhessem ezt a munkát.

Köszönöm tanárainknak, Dr. Maróy Péternek, Dr. Gausz Jánosnak, Dr. Gyurkovics Henriknek, Dr. Udvardy Andornak, Dr. Szidonya Jánosnak és Dr. Mink Mátyásnak, hogy megismertették és megszerettették velem a genetikát. Köszönöm Dr. Raskó Istvánnak, hogy megtartott az MTA SZBK Genetikai Intézetében.

Örökké adósa maradok témavezetőmnek, Gyurkovics Henriknek, aki munkámat irányította, és nagy odaadással segítette. Köszönöm a tudást, amit megosztott velem, és köszönöm a szakmai szemléletet, amit nélküle lehetetlen lett volna elsajátítanom.

Köszönöm a Gyurkovics Henrik vezette laboratórium minden jelenlegi és volt tagjának a rengeteg ötletet, a heves vitákat és az élvezetes szemináriumokat, amelyek mind hozzájárultak ahhoz, hogy szeressem a szakmát, amit választottam. Külön szeretnék köszönetet mondani Dr. Bajusz Izabellának, Dr. Sipos Lászlónak és Dr. Blastyák Andrásnak hasznos tanácsaikért és utam egyengetéséért. Köszönöm Dr. Bodai Lászlónak, hogy elkezdte a kísérleteket a *18.73.1* jelű transzgenikus konstrukcióval, és segített a folytatásban. Köszönöm Dr. Gausz Jánosnak, hogy saját munkájával is gyarapította a mutánsizolálási kísérleteink eredményeit. Köszönöm Pintér Lajos nélkülözhetetlen elméleti és gyakorlati segítségét a közösen végzett munkáink során. Köszönöm Pallos Judit és Ardó László munkatársaim társaságát, biztatását és sok-sok gyakorlati segítségét.

Szeretnék köszönetet mondani minden „hatodik és hetedik emeleti drozisnak”, hogy tanítottak, tanácsaikkal, ötleteikkel, tapasztalataikkal és eszközeikkel segítettek ennek a dolgozatnak az elkészültét.

Köszönöm Dongóné Gyányi Editnek és Kiss Anitának, hogy megbízható, pontos munkájukkal segítettek a gyakorlati teendők elvégzésében. Köszönöm Martonosi Györgyné Magdinak és Magyariné Gyöngyinek a kifogástalan táptalaj elkészítésével és a törzsek fenntartásával biztosított technikai segítségét.

Köszönöm Dr. Maróy Péternek és Dr. Szidonya Jánosnak, hogy a *bonus* gén P-elem indukált alléljait rendelkezésünkre bocsátották.

Köszönöm Kirsten Hagströmnek és Martin Müllernek, hogy rendelkezésünkre bocsátották transzgenikus törzseiket. Köszönöm Hugo J. Bellennek a *bonus* gén mutációival végzett kísérleteink során nyújtott készséges segítségét.

Köszönettel tartozom Dr. Andó Istvánnak, aki lehetővé tette, hogy laboratóriumában dolgozva befejezhessem ezt a dolgozatot, valamint nélkülözhetetlen segítséget nyújtott ahhoz, hogy teljesíthessem a doktori dolgozat beadásának feltételeit. Köszönöm az általa vezetett laboratórium tagjainak, elsősorban Dr. Kurucz Évának, hogy biztatásukkal segítettek abban, hogy elkészítsem ezt a munkát.

Köszönöm a házivédésem opponenseinek, Dr. Mihály Józsefnek és Dr. Jankovics Ferencnek, hogy alapos bírálatukkal és konstruktív javaslataikkal hozzájárultak, hogy ez a dolgozat jobbra válhasson.

Szeretném megköszönni családomnak; feleségemnek, Dr. Fricska Nagy Zsanettnek és fiamnak, Honti Patriknak, hogy szeretetükkel, megértésükkel és biztatásukkal támogattak a dolgozat megírása során. Köszönettel tartozom szüleimnek és feleségem szüleinek is; ők azok, akik mindenben támogattak, és megvigasztaltak, ha elkeseredtem.

Köszönöm minden barátomnak, elsősorban Zsámboki Jánosnak, Csordás Gábornak és Dr. Márkus Róbertnek a sok-sok bátorítást és baráti beszélgetést, melyekkel hozzájárultak ahhoz, hogy ez a dolgozat elkészülhessen.

Köszönettel tartozom az MTA Fiatal Kutatói ösztöndíjért, és a European Molecular Biology Organization (EMBO) szakmai kurzusáért.

**IRODALOMJEGYZÉK**

Akasaka T, van Lohuizen M, van der Lugt N, Mizutani-Koseki Y, Kanno M, Taniguchi M, Vidal M, Alkema M, Berns A, Koseki H. Mice doubly deficient for the Polycomb Group genes *Mel18* and *Bmi1* reveal synergy and requirement for maintenance but not initiation of Hox gene expression. *Development*. 2001 May; 128(9): 1587-97.

Akbari OS, Bae E, Johnsen H, Villaluz A, Wong D, Drewell RA. A novel promoter-tethering element regulates enhancer-driven gene expression at the bithorax complex in the *Drosophila* embryo. *Development*. 2008 Jan; 135(1): 123-31.

Akbari OS, Bousum A, Bae E, Drewell RA. Unraveling cis-regulatory mechanisms at the abdominal-A and Abdominal-B genes in the *Drosophila* bithorax complex. *Dev Biol*. 2006 May 15; 293(2): 294-304. Review.

Akbari OS, Schiller BJ, Goetz SE, Ho MC, Bae E, Drewell RA. The abdominal-B promoter tethering element mediates promoter-enhancer specificity at the *Drosophila* bithorax complex. *Fly (Austin)*. 2007 Nov-Dec; 1(6): 337-9.

Atchison L, Ghias A, Wilkinson F, Bonini N, Atchison ML. Transcription factor YY1 functions as a PcG protein in vivo. *EMBO J*. 2003 Mar 17; 22(6): 1347-58.

Bajusz I, Sipos L, Gyorgypal Z, Carrington EA, Jones RS, Gausz J, Gyurkovics H. The Trithorax-mimic allele of Enhancer of zeste renders active domains of target genes accessible to polycomb-group-dependent silencing in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 2001 Nov; 159(3): 1135-50.

Baker WK. Position-effect variegation. *Adv Genet*. 1968; 14: 133-69. Review.

Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*. 2001 Mar 1; 410(6824): 120-4.

Barges S, Mihaly J, Galloni M, Hagstrom K, Müller M, Shanower G, Schedl P, Gyurkovics H, Karch F. The Fab-8 boundary defines the distal limit of the bithorax complex iab-7 domain and insulates iab-7 from initiation elements and a PRE in the adjacent iab-8 domain. *Development*. 2000 Feb; 127(4): 779-90.

Beckstead RB, Ner SS, Hales KG, Grigliatti TA, Baker BS, Bellen HJ. Bonus, a *Drosophila* TIF1 homolog, is a chromatin-associated protein that acts as a modifier of position-effect variegation. *Genetics*. 2005 Feb; 169(2): 783-94.

Beckstead R, Ortiz JA, Sanchez C, Prokopenko SN, Chambon P, Losson R, Bellen HJ. Bonus, a *Drosophila* homolog of TIF1 proteins, interacts with nuclear receptors and can inhibit betaFTZ-F1-dependent transcription. *Mol Cell*. 2001 Apr; 7(4): 753-65.

Beckstead R, Prokopenko SN, Losson R, Chambon P, Bellen HJ. Bonus, a Drosophila TIF1 homolog, plays a role in hormone response. A Dros Res Conf 2000; 41 2000: 54.

Beisel C, Imhof A, Greene J, Kremmer E, Sauer F. Histone methylation by the Drosophila epigenetic transcriptional regulator Ash1. Nature. 2002 Oct 24; 419(6909): 857-62.

Bender W, Hudson A. P element homing to the Drosophila bithorax complex. Development. 2000 Sep; 127(18): 3981-92.

Bienz M, Muller J. Transcriptional silencing of homeotic genes in Drosophila. Bioessays. 1995 Sep; 17(9): 775-84. Review.

Blastyák A, Mishra RK, Karch F, Gyurkovics H. Efficient and specific targeting of Polycomb group proteins requires cooperative interaction between Grainyhead and Pleiohomeotic. Mol Cell Biol. 2006 Feb; 26(4): 1434-44.

Bloyer S, Cavalli G, Brock HW, Dura JM. Identification and characterization of polyhomeotic PREs and TREs. Dev Biol. 2003 Sep 15; 261(2): 426-42.

Boivin A, Dura JM. In vivo chromatin accessibility correlates with gene silencing in Drosophila. Genetics. 1998 Dec; 150(4): 1539-49.

Boulet AM, Lloyd A, Sakonju S. Molecular definition of the morphogenetic and regulatory functions and the cis-regulatory elements of the Drosophila Abd-B homeotic gene. Development. 1991 Feb; 111(2): 393-405.

Brock HW, van Lohuizen M. The Polycomb group - no longer an exclusive club? Curr Opin Genet Dev. 2001 Apr; 11(2): 175-81. Review.

Brown JL, Mucci D, Whiteley M, Dirksen ML, Kassis JA. The Drosophila Polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1. Mol Cell. 1998 Jun; 1(7): 1057-64.

Brown JL, Fritsch C, Mueller J, Kassis JA. The Drosophila pho-like gene encodes a YY1-related DNA binding protein that is redundant with pleiohomeotic in homeotic gene silencing. Development. 2003 Jan; 130(2): 285-94.

Busturia A, Bienz M. Silencers in abdominal-B, a homeotic Drosophila gene. EMBO J. 1993 Apr; 12(4): 1415-25.

Busturia A, Casanova J, Sanchez-Herrero E, Morata G. Structure and function of the bithorax complex genes of Drosophila. Ciba Found Symp. 1989; 144: 227-38; discussion 239-42, 290-5.

Busturia A, Lloyd A, Bejarano F, Zavortink M, Xin H, Sakonju S. The MCP silencer of the Drosophila Abd-B gene requires both Pleiohomeotic and GAGA factor for the maintenance of repression. Development. 2001 Jun; 128(11): 2163-73.

Cammas F, Janoshazi A, Lerouge T, Losson R. Dynamic and selective interactions of the transcriptional corepressor TIF1 beta with the heterochromatin protein HP1 isotypes during cell differentiation. Differentiation. 2007 Sep; 75(7): 627-37.



Cammas F, Oulad-Abdelghani M, Vonesch JL, Huss-Garcia Y, Chambon P, Losson R. Cell differentiation induces TIF1beta association with centromeric heterochromatin via an HP1 interaction. J Cell Sci. 2002 Sep 1; 115(Pt 17): 3439-48.

Campbell RB, Sinclair DA, Couling M, Brock HW. Genetic interactions and dosage effects of Polycomb group genes of Drosophila. Mol Gen Genet. 1995 Feb 6; 246(3): 291-300.

Carrington EA, Jones RS. The Drosophila Enhancer of zeste gene encodes a chromosomal protein: examination of wild type and mutant protein distribution. Development. 1996 Dec; 122(12): 4073-83.

Casares F, Sanchez-Herrero E. Regulation of the infraabdominal regions of the bithorax complex of Drosophila by gap genes. Development. 1995 Jun; 121(6): 1855-66.

Cavalli G, Paro R. Epigenetic inheritance of active chromatin after removal of the main transactivator. Science. 1999 Oct 29; 286(5441): 955-8.

Celniker SE, Keelan DJ, Lewis EB. The molecular genetics of the bithorax complex of Drosophila: characterization of the products of the Abdominal-B domain. Genes Dev. 1989 Sep; 3(9): 1424-36.

Celniker SE, Sharma S, Keelan DJ, Lewis EB. The molecular genetics of the bithorax complex of Drosophila: cis-regulation in the Abdominal-B domain. EMBO J. 1990 Dec; 9(13): 4277-86.

Chan CS, Rastelli L, Pirrotta V. A Polycomb response element in the Ubx gene that determines an epigenetically inherited state of repression. EMBO J. 1994 Jun 1; 13(11): 2553-64.

Chang YL, Peng YH, Pan IC, Sun DS, King B, Huang DH. Essential role of Drosophila Hdac1 in homeotic gene silencing. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Aug 14; 98(17): 9730-5.

Cheng NN, Sinclair DA, Campbell RB, Brock HW. Interactions of polyhomeotic with Polycomb group genes of Drosophila melanogaster. Genetics. 1994 Dec; 138(4): 1151-62.

Chiang A, O'Connor MB, Paro R, Simon J, Bender W. Discrete Polycomb-binding sites in each parasegmental domain of the bithorax complex. Development. 1995 Jun; 121(6): 1681-9.

Collins RT, Furukawa T, Tanese N, Treisman JE. Osa associates with the Brahma chromatin remodeling complex and promotes the activation of some target genes. EMBO J. 1999 Dec 15; 18(24): 7029-40.

Crosby MA, Miller C, Alon T, Watson KL, Verrijzer CP, Goldman-Levi R, Zak NB. The trithorax group gene moira encodes a brahma-associated putative chromatin-remodeling factor in Drosophila melanogaster. Mol Cell Biol. 1999 Feb; 19(2): 1159-70.

DeCamillis M, Cheng NS, Pierre D, Brock HW. The polyhomeotic gene of Drosophila encodes a chromatin protein that shares polytene chromosome-binding sites with Polycomb. Genes Dev. 1992 Feb; 6(2): 223-32.

DeLorenzi M, Ali N, Saari G, Henry C, Wilcox M, Bienz M. Evidence that the Abdominal-B r element function is conferred by a trans-regulatory homeoprotein. EMBO J. 1988 Oct; 7(10): 3223-31.

Denell RE, Frederick RD. Homoeosis in Drosophila: a description of the Polycomb lethal syndrome. Dev Biol. 1983 May; 97(1): 34-47.

Dietzel S, Niemann H, Bruckner B, Maurange C, Paro R. The nuclear distribution of Polycomb during Drosophila melanogaster development shown with a GFP fusion protein. Chromosoma. 1999 May; 108(2): 83-94.

Digan ME, Haynes SR, Mozer BA, Dawid IB, Forquignon F, Gans M. Genetic and molecular analysis of fs(1)h, a maternal effect homeotic gene in Drosophila. Dev Biol. 1986 Mar; 114(1): 161-9.

Dingwall AK, Beek SJ, McCallum CM, Tamkun JW, Kalpana GV, Goff SP, Scott MP. The Drosophila snr1 and brm proteins are related to yeast SWI/SNF proteins and are components of a large protein complex. Mol Biol Cell. 1995 Jul; 6(7): 777-91.

Drewell RA, Bae E, Burr J, Lewis EB. Transcription defines the embryonic domains of cis-regulatory activity at the Drosophila bithorax complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Dec 24; 99(26): 16853-8.

Duncan IW. Transvection effects in Drosophila. Annu Rev Genet. 2002; 36: 521-56. Review.

Eissenberg JC, Lee MG, Schneider J, Ilvarsonn A, Shiekhattar R, Shilatifard A. The trithorax-group gene in *Drosophila* little imaginal discs encodes a trimethylated histone H3 Lys4 demethylase. *Nat Struct Mol Biol.* 2007 Apr; 14(4): 344-6.

Farkas G, Gausz J, Galloni M, Reuter G, Gyurkovics H, Karch F. The Trithorax-like gene encodes the *Drosophila* GAGA factor. *Nature.* 1994 Oct 27; 371(6500): 806-8.

Faust C, Lawson KA, Schork NJ, Thiel B, Magnuson T. The Polycomb-group gene *eed* is required for normal morphogenetic movements during gastrulation in the mouse embryo. *Development.* 1998 Nov; 125(22): 4495-506.

Fauvarque MO, Dura JM. polyhomeotic regulatory sequences induce developmental regulator-dependent variegation and targeted P-element insertions in *Drosophila*. *Genes Dev.* 1993 Aug; 7(8): 1508-20.

Felsenfeld G. Chromatin unfolds. *Cell.* 1996 Jul 12; 86(1): 13-9. Review.

Franke A, DeCamillis M, Zink D, Cheng N, Brock HW, Paro R. Polycomb and polyhomeotic are constituents of a multimeric protein complex in chromatin of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* 1992 Aug; 11(8): 2941-50.

Fraser RA, Heard DJ, Adam S, Lavigne AC, Le Douarin B, Tora L, Losson R, Rochette-Egly C, Chambon P. The putative cofactor TIF1alpha is a protein kinase that is hyperphosphorylated upon interaction with liganded nuclear receptors. *J Biol Chem.* 1998 Jun 26; 273(26): 16199-204.

Gindhart JG Jr, Kaufman TC. Identification of Polycomb and trithorax group responsive elements in the regulatory region of the Drosophila homeotic gene Sex combs reduced. Genetics. 1995 Feb; 139(2): 797-814.

Goodrich J, Puangsomlee P, Martin M, Long D, Meyerowitz EM, Coupland G. A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in Arabidopsis. Nature. 1997 Mar 6; 386(6620): 44-51.

Gould A. Functions of mammalian Polycomb group and trithorax group related genes. Curr Opin Genet Dev. 1997 Aug; 7(4): 488-94. Review.

Gruzdeva N, Kyrchanova O, Parshikov A, Kullyev A, Georgiev P. The Mcp element from the bithorax complex contains an insulator that is capable of pairwise interactions and can facilitate enhancer-promoter communication. Mol Cell Biol. 2005 May; 25(9): 3682-9.

Gyurkovics H, Gausz J, Kummer J, Karch F. A new homeotic mutation in the Drosophila bithorax complex removes a boundary separating two domains of regulation. EMBO J. 1990 Aug; 9(8): 2579-85.

Hagström K, Müller M, Schedl P. Fab-7 functions as a chromatin domain boundary to ensure proper segment specification by the Drosophila bithorax complex. Genes Dev. 1996 Dec 15; 10(24): 3202-15.

Hagström K, Müller M, Schedl P. A Polycomb and GAGA dependent silencer adjoins the Fab-7 boundary in the Drosophila bithorax complex. Genetics. 1997 Aug; 146(4): 1365-80.

Horard B, Tatout C, Poux S, Pirrotta V. Structure of a polycomb response element and in vitro binding of polycomb group complexes containing GAGA factor. Mol Cell Biol. 2000 May; 20(9): 3187-97.

Huang DH, Chang YL, Yang CC, Pan IC, King B. pipsqueak encodes a factor essential for sequence-specific targeting of a polycomb group protein complex. Mol Cell Biol. 2002 Sep; 22(17): 6261-71.

Iampietro C, Cléard F, Gyurkovics H, Maeda RK, Karch F. Boundary swapping in the Drosophila Bithorax complex. Development. 2008 Dec; 135(24): 3983-7.

Jacobs SA, Taverna SD, Zhang Y, Briggs SD, Li J, Eissenberg JC, Allis CD, Khorasanizadeh S. Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. EMBO J. 2001 Sep 17; 20(18): 5232-41.

Jürgens G. A group of genes controlling the spatial expression of the bithorax complex in Drosophila. Nature. 1985 Jul 11; 316: 153-5.

Karch F, Bender W, Weiffenbach B. abdA expression in Drosophila embryos. Genes Dev. 1990 Sep; 4(9): 1573-87.

Karch F, Galloni M, Sipos L, Gausz J, Gyurkovics H, Schedl P. Mcp and Fab-7: molecular analysis of putative boundaries of cis-regulatory domains in the bithorax complex of Drosophila melanogaster. Nucleic Acids Res. 1994 Aug 11; 22(15): 3138-46.

Kassis JA, Desplan C, Wright DK, O'Farrell PH. Evolutionary conservation of homeodomain-binding sites and other sequences upstream and within the major transcription unit of the *Drosophila* segmentation gene engrailed. *Mol Cell Biol.* 1989 Oct; 9(10): 4304-11.

Kassis JA. Unusual properties of regulatory DNA from the *Drosophila* engrailed gene: three "pairing-sensitive" sites within a 1.6-kb region. *Genetics.* 1994 Mar; 136(3): 1025-38.

Kehle J, Beuchle D, Treuheit S, Christen B, Kennison JA, Bienz M, Muller J. dMi-2, a hunchback-interacting protein that functions in polycomb repression. *Science.* 1998 Dec 4; 282(5395): 1897-900.

Kennison JA. The Polycomb and trithorax group proteins of *Drosophila*: trans-regulators of homeotic gene function. *Annu Rev Genet.* 1995; 29: 289-303. Review.

Kingston RE, Bunker CA, Imbalzano AN. Repression and activation by multiprotein complexes that alter chromatin structure. *Genes Dev.* 1996 Apr 15; 10(8): 905-20. Review.

Klymenko T, Papp B, Fischle W, Kocher T, Schelder M, Fritsch C, Wild B, Wilm M, Muller J. A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities. *Genes Dev.* 2006 May 1; 20(9): 1110-22.

Kornfeld K, Saint RB, Beachy PA, Harte PJ, Peattie DA, Hogness DS. Structure and expression of a family of Ultrabithorax mRNAs generated by alternative splicing and polyadenylation in *Drosophila*. *Genes Dev.* 1989 Feb; 3(2): 243-58.

Kuziora MA, McGinnis W. Autoregulation of a *Drosophila* homeotic selector gene. *Cell*. 1988 Nov 4; 55(3): 477-85.

Kyba M, Brock HW. The *Drosophila* polycomb group protein Psc contacts ph and Pc through specific conserved domains. *Mol Cell Biol*. 1998 May; 18(5): 2712-20.

Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*. 2001 Mar 1; 410(6824): 116-20.

Laible G, Wolf A, Dorn R, Reuter G, Nislow C, Lebersorger A, Popkin D, Pillus L, Jenuwein T. Mammalian homologues of the Polycomb-group gene Enhancer of zeste mediate gene silencing in *Drosophila* heterochromatin and at *S. cerevisiae* telomeres. *EMBO J*. 1997 Jun 2; 16(11): 3219-32.

Lee N, Zhang J, Klose RJ, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. The trithorax-group protein Lid is a histone H3 trimethyl-Lys4 demethylase. *Nat Struct Mol Biol*. 2007 Apr; 14(4): 341-3.

Lewis EB. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*. 1978 Dec 7; 276(5688): 565-70.

Lewis EB. Regulation of the genes of the bithorax complex in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1985; 50: 155-64.



Lewis EB. The theory and application of a new method of detecting chromosomal rearrangements in *Drosophila melanogaster*. Am Nat. 1954; 88: 225–39.

Li J, Lin Q, Yoon HG, Huang ZQ, Strahl BD, Allis CD, Wong J. Involvement of histone methylation and phosphorylation in regulation of transcription by thyroid hormone receptor. Mol Cell Biol. 2002 Aug; 22(16): 5688-97.

Lindsley DL, Zimm GG. The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego. 1992.

Lonie A, D'Andrea R, Paro R, Saint R. Molecular characterisation of the Polycomblike gene of *Drosophila melanogaster*, a trans-acting negative regulator of homeotic gene expression. Development. 1994 Sep; 120(9): 2629-36.

Macias A, Casanova J, Morata G. Expression and regulation of the abd-A gene of *Drosophila*. Development. 1990 Dec; 110(4): 1197-207.

Maeda RK, Karch F. The ABC of the BX-C: the bithorax complex explained. Development. 2006 Apr; 133(8): 1413-22. Review.

Martin EC, Adler PN. The Polycomb group gene Posterior Sex Combs encodes a chromosomal protein. Development. 1993 Feb; 117(2): 641-55.

Martin CH, Mayeda CA, Davis CA, Ericsson CL, Knafels JD, Mathog DR, Celniker SE, Lewis EB, Palazzolo MJ. Complete sequence of the bithorax complex of *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Aug 29; 92(18): 8398-402.

Martinez AM, Cavalli G. The role of polycomb group proteins in cell cycle regulation during development. Cell Cycle. 2006 Jun; 5(11): 1189-97. Review.

McCall K, Bender W. Probes of chromatin accessibility in the *Drosophila* bithorax complex respond differently to Polycomb-mediated repression. EMBO J. 1996 Feb 1; 15(3): 569-80.

McCall K, O'Connor MB, Bender W. Enhancer traps in the *Drosophila* bithorax complex mark parasegmental domains. Genetics. 1994 Oct; 138(2): 387-99.

Messmer S, Franke A, Paro R. Analysis of the functional role of the Polycomb chromo domain in *Drosophila melanogaster*. Genes Dev. 1992 Jul; 6(7): 1241-54.

Mihaly J, Barges S, Sipos L, Maeda R, Cléard F, Hogga I, Bender W, Gyurkovics H, Karch F. Dissecting the regulatory landscape of the Abd-B gene of the bithorax complex. Development. 2006 Aug; 133(15): 2983-93.

Mihaly J, Hogga I, Barges S, Galloni M, Mishra RK, Hagstrom K, Müller M, Schedl P, Sipos L, Gausz J, Gyurkovics H, Karch F. Chromatin domain boundaries in the Bithorax complex. Cell Mol Life Sci. 1998 Jan; 54(1): 60-70. Review.

Mihaly J, Hogga I, Gausz J, Gyurkovics H, Karch F. In situ dissection of the Fab-7 region of the bithorax complex into a chromatin domain boundary and a Polycomb-response element. *Development*. 1997 May; 124(9): 1809-20.

Mishra RK, Mihaly J, Barges S, Spierer A, Karch F, Hagström K, Schweinsberg SE, Schedl P. The iab-7 polycomb response element maps to a nucleosome-free region of chromatin and requires both GAGA and pleiohomeotic for silencing activity. *Mol Cell Biol*. 2001 Feb; 21(4): 1311-8.

Müller J, Gaunt S, Lawrence PA. Function of the Polycomb protein is conserved in mice and flies. *Development*. 1995 Sep; 121(9): 2847-52.

Nekrasov M, Klymenko T, Fraterman S, Papp B, Oktaba K, Köcher T, Cohen A, Stunnenberg HG, Wilm M, Müller J. Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3-K27 trimethylation at Polycomb target genes. *EMBO J*. 2007 Sep 19; 26(18): 4078-88.

Nielsen AL, Ortiz JA, You J, Oulad-Abdelghani M, Khechumian R, Gansmuller A, Chambon P, Losson R. Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family. *EMBO J*. 1999 Nov 15; 18(22): 6385-95.

Ng J, Hart CM, Morgan K, Simon JA. A *Drosophila* ESC-E(Z) protein complex is distinct from other polycomb group complexes and contains covalently modified ESC. *Mol Cell Biol*. 2000 May; 20(9): 3069-78.

Ng HH, Feng Q, Wang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Zhang Y, Struhl K. Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association. *Genes Dev.* 2002 Jun 15; 16(12): 1518-27.

O'Connell S, Wang L, Robert S, Jones CA, Saint R, Jones RS. Polycomblike PHD fingers mediate conserved interaction with enhancer of zeste protein. *J Biol Chem.* 2001 Nov 16; 276(46): 43065-73.

O'Connor MB, Binari R, Perkins LA, Bender W. Alternative RNA products from the Ultrabithorax domain of the bithorax complex. *EMBO J.* 1988 Feb; 7(2): 435-45.

Orlando V, Jane EP, Chinwalla V, Harte PJ, Paro R. Binding of trithorax and Polycomb proteins to the bithorax complex: dynamic changes during early *Drosophila* embryogenesis. *EMBO J.* 1998 Sep 1; 17(17): 5141-50.

Papp B, Müller J. Histone trimethylation and the maintenance of transcriptional ON and OFF states by trxG and PcG proteins. *Genes Dev.* 2006 Aug 1; 20(15): 2041-54.

Paro R. Imprinting a determined state into the chromatin of *Drosophila*. *Trends Genet.* 1990 Dec; 6(12): 416-21. Review.

Paro R, Hogness DS. The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jan 1; 88(1): 263-7.

Peterson CL. Multiple SWItches to turn on chromatin? Curr Opin Genet Dev. 1996 Apr; 6(2): 171-5. Review.

Peterson AJ, Kyba M, Bornemann D, Morgan K, Brock HW, Simon J. A domain shared by the Polycomb group proteins Scm and ph mediates heterotypic and homotypic interactions. Mol Cell Biol. 1997 Nov; 17(11): 6683-92.

Pirrotta V. Transvection and long-distance gene regulation. Bioessays. 1990 Sep; 12(9): 409-14. Review.

Pirrotta V. Polycombining the Genome: PcG, trxG, and Chromatin Silencing. Cell. 1998 May 1; 93(3): 333-6. Review.

Pirrotta V, Chan CS, McCabe D, Qian S. Distinct parasegmental and imaginal enhancers and the establishment of the expression pattern of the Ubx gene. Genetics. 1995 Dec; 141(4): 1439-50.

Pirrotta V, Rastelli L. White gene expression, repressive chromatin domains and homeotic gene regulation in Drosophila. Bioessays. 1994 Aug; 16(8): 549-56. Review.

Plath K, Talbot D, Hamer KM, Otte AP, Yang TP, Jaenisch R, Panning B. Developmentally regulated alterations in Polycomb repressive complex 1 proteins on the inactive X chromosome. J Cell Biol. 2004 Dec 20; 167(6): 1025-35.

Poux S, Kostic C, Pirrotta V. Hunchback-independent silencing of late Ubx enhancers by a Polycomb Group Response Element. EMBO J. 1996 Sep 2; 15(17): 4713-22.

Rastelli L, Chan CS, Pirrotta V. Related chromosome binding sites for zeste, suppressors of zeste and Polycomb group proteins in Drosophila and their dependence on Enhancer of zeste function. EMBO J. 1993 Apr; 12(4): 1513-22.

Remboutsika E, Yamamoto K, Harbers M, Schmutz M. The bromodomain mediates transcriptional intermediary factor 1alpha -nucleosome interactions. J Biol Chem. 2002 Dec 27; 277(52): 50318-25.

Reuter G, Dorn R, Hoffmann HJ. Butyrate sensitive suppressor of position-effect variegation mutations in Drosophila melanogaster. Mol Gen Genet. 1982; 188(3): 480-5.

Reuter G, Spierer P. Position effect variegation and chromatin proteins. Bioessays. 1992 Sep; 14(9): 605-12. Review.

Reuter G, Werner W, Hoffmann HJ. Mutants affecting position-effect heterochromatinization in Drosophila melanogaster. Chromosoma. 1982; 85(4): 539-51.

Reuter G, Wolff I. Isolation of dominant suppressor mutations for position-effect variegation in Drosophila melanogaster. Mol Gen Genet. 1981; 182(3): 516-9.

Rozovskaia T, Tillib S, Smith S, Sedkov Y, Rozenblatt-Rosen O, Petruk S, Yano T, Nakamura T, Ben-Simchon L, Gildea J, Croce CM, Shearn A, Canaani E, Mazo A. Trithorax and ASH1 interact directly and associate with the trithorax group-responsive bxd region of the Ultrabithorax promoter. *Mol Cell Biol.* 1999 Sep; 19(9): 6441-7.

Salzberg A, Prokopenko SN, He Y, Tsai P, Pal M, Maroy P, Glover DM, Deak P, Bellen HJ. P-element insertion alleles of essential genes on the third chromosome of *Drosophila melanogaster*: Mutations affecting embryonic PNS development. *Genetics.* 1997 Dec; 147(4): 1723-41.

Sanchez-Herrero E, Vernos I, Marco R, Morata G. Genetic organization of *Drosophila* bithorax complex. *Nature.* 1985 Jan 10-18; 313(5998): 108-13.

Sanchez-Herrero E. Control of the expression of the bithorax complex genes abdominal-A and abdominal-B by cis-regulatory regions in *Drosophila* embryos. *Development.* 1991 Feb; 111(2): 437-49.

Sanchez-Herrero E, Akam M. Spatially ordered transcription of regulatory DNA in the bithorax complex of *Drosophila*. *Development.* 1989 Oct; 107(2): 321-9.

Saurin AJ, Shao Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Kingston RE. A *Drosophila* Polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins. *Nature.* 2001 Aug 9; 412(6847): 655-60.

Savla U, Benes J, Zhang J, Jones RS. Recruitment of Drosophila Polycomb-group proteins by Polycomblike, a component of a novel protein complex in larvae. Development. 2008 Mar; 135(5): 813-7.

Schoeftner S, Sengupta AK, Kubicek S, Mechtler K, Spahn L, Koseki H, Jenuwein T, Wutz A. Recruitment of PRC1 function at the initiation of X inactivation independent of PRC2 and silencing. EMBO J. 2006 Jul 12; 25(13): 3110-22.

Schumacher A, Magnuson T. Murine Polycomb- and trithorax-group genes regulate homeotic pathways and beyond. Trends Genet. 1997 May; 13(5): 167-70.

Scott MJ, Pan LL, Cleland SB, Knox AL, Heinrich J. MSL1 plays a central role in assembly of the MSL complex, essential for dosage compensation in Drosophila. EMBO J. 2000 Jan 4; 19(1): 144-55.

Shao Z, Raible F, Mollaaghababa R, Guyon JR, Wu CT, Bender W, Kingston RE. Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. Cell. 1999 Jul 9; 98(1): 37-46.

Shanower GA, Müller M, Blanton JL, Honti V, Gyurkovics H, Schedl P. Characterization of the grappa gene, the Drosophila histone H3 lysine 79 methyltransferase. Genetics. 2005 Jan; 169(1): 173-84.



Sigrist CJ, Pirrotta V. Chromatin insulator elements block the silencing of a target gene by the *Drosophila* polycomb response element (PRE) but allow trans interactions between PREs on different chromosomes. *Genetics*. 1997 Sep; 147(1): 209-21.

Simon J. Locking in stable states of gene expression: transcriptional control during *Drosophila* development. *Curr Opin Cell Biol*. 1995 Jun; 7(3): 376-85. Review.

Simon J, Chiang A, Bender W, Shimell MJ, O'Connor M. Elements of the *Drosophila* bithorax complex that mediate repression by Polycomb group products. *Dev Biol*. 1993 Jul; 158(1): 131-44.

Simon J, Peifer M, Bender W, O'Connor M. Regulatory elements of the bithorax complex that control expression along the anterior-posterior axis. *EMBO J*. 1990 Dec; 9(12): 3945-56.

Sinclair DA, Clegg NJ, Antonchuk J, Milne TA, Stankunas K, Ruse C, Grigliatti TA, Kassis JA, Brock HW. Enhancer of Polycomb is a suppressor of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 1998 Jan; 148(1): 211-20.

Sinclair DA, Milne TA, Hodgson JW, Shellard J, Salinas CA, Kyba M, Randazzo F, Brock HW. The Additional sex combs gene of *Drosophila* encodes a chromatin protein that binds to shared and unique Polycomb group sites on polytene chromosomes. *Development*. 1998 Apr; 125(7): 1207-16.

Sipos L, Mihaly J, Karch F, Schedl P, Gausz J, Gyurkovics H. Transvection in the Drosophila Abd-B domain: extensive upstream sequences are involved in anchoring distant cis-regulatory regions to the promoter. *Genetics*. 1998 Jun; 149(2): 1031-50.

Srinivasan S, Dorigi KM, Tamkun JW. Drosophila Kismet regulates histone H3 lysine 27 methylation and early elongation by RNA polymerase II. *PLoS Genet*. 2008 Oct; 4(10): e1000217.

Stankunas K, Berger J, Ruse C, Sinclair DA, Randazzo F, Brock HW. The enhancer of polycomb gene of Drosophila encodes a chromatin protein conserved in yeast and mammals. *Development*. 1998 Oct; 125(20): 4055-66.

Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000 Jan 6; 403(6765): 41-5.

Strouboulis J, Wolffe AP. Functional compartmentalization of the nucleus. *J Cell Sci*. 1996 Aug; 109(Pt 8): 1991-2000. Review.

Strutt H, Paro R. The polycomb group protein complex of Drosophila melanogaster has different compositions at different target genes. *Mol Cell Biol*. 1997 Dec; 17(12): 6773-83.

Tamkun JW. The role of brahma and related proteins in transcription and development. *Curr Opin Genet Dev*. 1995 Aug; 5(4): 473-7. Review.

Tie F, Furuyama T, Harte PJ. The Drosophila Polycomb Group proteins ESC and E(Z) bind directly to each other and co-localize at multiple chromosomal sites. Development. 1998 Sep; 125(17): 3483-96.

Tie F, Furuyama T, Prasad-Sinha J, Jane E, Harte PJ. The Drosophila Polycomb Group proteins ESC and E(Z) are present in a complex containing the histone-binding protein p55 and the histone deacetylase RPD3. Development. 2001 Jan; 128(2): 275-86.

Tillib S, Petruk S, Sedkov Y, Kuzin A, Fujioka M, Goto T, Mazo A. Trithorax- and Polycomb-group response elements within an Ultrabithorax transcription maintenance unit consist of closely situated but separable sequences. Mol Cell Biol. 1999 Jul; 19(7): 5189-202.

Tiong S, Bone LM, Whittle JR. Recessive lethal mutations within the bithorax-complex in Drosophila. Mol Gen Genet. 1985; 200(2): 335-42.

Tomotsune D, Takihara Y, Berger J, Duhl D, Joo S, Kyba M, Shirai M, Ohta H, Matsuda Y, Honda BM, Simon J, Shimada K, Brock HW, Randazzo F. A novel member of murine Polycomb-group proteins, Sex comb on midleg homolog protein, is highly conserved, and interacts with RAE28/mph1 in vitro. Differentiation. 1999 Dec; 65(4): 229-39.

Tsukiyama T, Daniel C, Tamkun J, Wu C. ISWI, a member of the SWI2/SNF2 ATPase family, encodes the 140 kDa subunit of the nucleosome remodeling factor. Cell. 1995 Dec 15; 83(6): 1021-6.

Tsukiyama T, Wu C. Purification and properties of an ATP-dependent Nucleosome Remodelling Factor. Cell. 1995 Dec 15; 83(6): 1011-20.

Turner BM. Histone acetylation and an epigenetic code. Bioessays. 2000 Sep; 22(9): 836-45. Review.

Valk-Lingbeek ME, Bruggeman SW, van Lohuizen M. Stem cells and cancer; the polycomb connection. Cell. 2004 Aug 20; 118(4): 409-18. Review.

van Leeuwen F, Gafken PR, Gottschling DE. Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. Cell. 2002 Jun 14; 109(6): 745-56.

van Lohuizen M, Tijms M, Voncken JW, Schumacher A, Magnuson T, Wientjens E. Interaction of mouse polycomb-group (Pc-G) proteins Enx1 and Enx2 with Eed: indication for separate Pc-G complexes. Mol Cell Biol. 1998 Jun; 18(6): 3572-9.

van Lohuizen M. The trithorax-group and polycomb-group chromatin modifiers: implications for disease. Curr Opin Genet Dev. 1999 Jun; 9(3): 355-61. Review.

Venturini L, You J, Stadler M, Galien R, Lallemand V, Koken MH, Mattei MG, Ganser A, Chambon P, Losson R, de The H. TIF1gamma, a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. Oncogene. 1999 Feb 4; 18(5): 1209-17.

Wallrath LL, Elgin SC. Position effect variegation in Drosophila is associated with an altered chromatin structure. Genes Dev. 1995 May 15; 9(10): 1263-77.

White RA, Wilcox M. Protein products of the bithorax complex in Drosophila. Cell. 1984 Nov; 39(1): 163-71.

Wu C, Howe M. A Genetic Analysis of the Suppressor 2 of zeste complex of Drosophila melanogaster. Genetics. 1995 May; 140(1): 139-81.

Yoshida N, Yanai Y, Chen L, Kato Y, Hiratsuka J, Miwa T, Sung ZR, Takahashi S. EMBRYONIC FLOWER2, a novel polycomb group protein homolog, mediates shoot development and flowering in Arabidopsis. Plant Cell. 2001 Nov; 13(11): 2471-81.

Zavortink M, Sakonju S. The morphogenetic and regulatory functions of the Drosophila Abdominal-B gene are encoded in overlapping RNAs transcribed from separate promoters. Genes Dev. 1989 Dec; 3(12A): 1969-81.

Zhang Y, LeRoy G, Seelig HP, Lane WS, Reinberg D. The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. Cell. 1998 Oct 16; 95(2): 279-89.

Zhao J, Sun BK, Erwin JA, Song JJ, Lee JT. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. Science. 2008 Oct 31; 322(5902): 750-6.

Zink B, Engstrom Y, Gehring WJ, Paro R. Direct interaction of the Polycomb protein with Antennapedia regulatory sequences in polytene chromosomes of Drosophila melanogaster. EMBO J. 1991 Jan; 10(1): 153-62.

Zink B, Paro R. In vivo binding pattern of a trans-regulator of homoeotic genes in *Drosophila melanogaster*. *Nature*. 1989 Feb 2; 337(6206): 468-71.

Zink D, Paro R. *Drosophila* Polycomb-group regulated chromatin inhibits the accessibility of a trans-activator to its target DNA. *EMBO J*. 1995 Nov 15; 14(22): 5660-71.

## ÖSSZEFOGLALÓ

A *Drosophila melanogaster* homeotikus génjei két nagy homeotikus génkomplexet alkotnak. Az *Antennapedia*-komplex (ANT-C) a fejtől a középtorig, a *bithorax*-komplex (BX-C) a középtortól hátrafelé elhelyezkedő szelvények identitásának kialakításáért felelős.

A BX-C három homeotikus gént kódol (*Ultrabithorax*, *abdominal-A*, *Abdominal-B*), melyek a komplex hatása alatt álló szelvények identitását nagy kiterjedésű, szelvényt specifikus *cisz*-regulátor elemek segítségével határozzák meg. Minden egyes szelvényben egy újabb *cisz*-regulátor elem kapcsol be (válík nyitottá a kromatinszerkezete), és ennek hatására vagy egy újabb homeotikus gén aktiválódik, vagy az előző szelvényben is aktív homeotikus gén expressziós szintje emelkedik meg.

Ahhoz, hogy a homeotikus gének korán kialakult expressziós szintje változatlan maradjon a teljes egyedfejlődés során, két nagy géncsoport által kódolt fehérjék járulnak hozzá. A POLYCOMB-csoportba (PCG) tartozó fehérjék represszáló multimer komplexeket létrehozva a *cisz*-regulátorok inaktív állapotának (zárt kromatinkonformációjának) fenntartásáért felelősek, míg a TRITHORAX-csoport (TRXG) tagjai az aktív *cisz*-regulátorok (nyílt kromatinkonformációjú) állapotát tartják fenn. A POLYCOMB, illetve TRITHORAX-csoportba tartozó fehérjék támadáspontjai a homeotikus gének *cisz*-regulátoraiban található PRE- (Polycomb Response Element), illetve TRE-szakaszok (TRE: Trithorax Response Element).

A *Polycomb*-csoport tagjait kezdetben főleg a mutáns allélok homeotikus fenotípusa, illetve genetikai interakciói alapján azonosították. Bár a *Polycomb*-csoportba tartozó gének számát 40-re becsülték, hagyományos mutánsizolálási kísérletekben csupán mintegy 15-öt sikerült azonosítani.

Munkánk egyik fő célja az volt, hogy nagyszabású mutagenézis kísérletek segítségével a *Polycomb*- és a *trithorax*-csoport eddig ismeretlen tagjait azonosítsuk, illetve az újonnan azonosított allélok segítségével további ismereteket szerezzünk a homeotikus gének *cis*-regulátorainak szerkezetéről és a rajtuk felépülő fehérjekomplexek működéséről.

Kísérleteink során olyan transzgenikus konstrukciókat használtunk, melyek a *miniwhite* riportergén és annak enhanszere között egy izolált PRE szakaszt, az *iab-7* PRE-t tartalmazták beépítve. A konstrukcióba épített riportergén expressziója párosodás-függő módon érzékeny a *Polycomb*-, illetve a *trithorax*-csoportba tartozó gének dózisára: a *Polycomb*-csoport mutációi sötétítik, míg a *trithorax*-csoport mutációi világosítják a transzgenikus konstrukcióra nézve homozigóta állatok szemszínét.

A *Fab-7* régió *ApaI*-*XbaI* fragmentjét tartalmazó 18.73.1 vonal háttérében EMS-, a minimál PRE funkciót mutató DNS szakaszt (HS3; 260 bp) tartalmazó 102.103.2 vonal háttérében röntgensugárzás-indukált mutagenézis kísérletet végeztünk. Arra számítottunk, hogy míg röntgensugárzással elsősorban funkcióvesztéssel mutációkat azonosítunk, addig EMS-sel funkciónyeréssel mutációkat is izolálhatunk.

A 18.73.1 transzgenikus vonal háttérében végzett kísérletben 35 új komplementációs csoportot azonosítottunk, míg a 102.103.2 vonal háttérében 50 olyan mutációt izoláltunk, melyek mind komplementálják a *Polycomb*-, illetve a *trithorax*-csoport eddig ismert tagjainak vizsgált mutációit. A két mutagenézis kísérlet során a következő, korábban is ismert gének alléljait azonosítottuk: *Suppressor of Polycomb at 37D* (*Su(Pc)37D*) (1 allél), *wingless* (*wg*) (3 allél), *Polycomblike* (*Pcl*) (13 allél), *Suppressor of zeste 12* (*Su(z)12*) (1 allél), *Posterior sex combs* (*Psc*) (3 allél), *Sex comb on midleg* (*Scm*) (15 allél), *verthandi* (*vtd*) (1 allél), *Suppressor of zeste 2* (*Su(z)2*) (1 allél) és *male-specific lethal*-típusú allélok (*msl*) (2 allél). Nem azonosítottunk egyetlen *Polycomb* (*Pc*), *Enhancer of zeste* (*E(z)*), vagy *trithorax* (*trx*)



allélt sem, izoláltunk azonban a *Df(3L)kto2* delécióján belül egy eddig ismeretlen komplementációs csoportot, melynek a *kohtalo2* (*kto2*) nevet adtuk (3 allél).

Sikerült azonosítanunk két eddig ismeretlen komplementációs csoportot, amelyeket - a konstrukcióban található riporter gén expressziójára gyakorolt hatásuk alapján - *Fehér szem*-nek (*Fes*; 3 allél) és *Piros szem*-nek (*Pis*; 8 allél) neveztünk el.

Az ellentmondásos fenotípusuk alapján funkcionyerésesnek tűnő allélokat röntgensugárzással revertálni próbáltuk. A reverzió több esetben is sikerrel járt. Meghatároztuk a revertánsok kromoszómáinak közös töréspontjait, majd komplementációs analízis segítségével megállapítottuk, hogy a *18.73.1* transzgenikus vonal háttérében azonosított *94A* a *grappa* (*gpp*), míg a *117A* a *bonus* (*bon*) gén mutáns allélja. A *bon*<sup>117A</sup> revertánsainak segítségével az is kiderült, hogy a harmadik kromoszómán azonosított 4 tagú világosító komplementációs csoport azonos a *bon* génnel. A reverziós kísérletek során azonosítottunk több világosító mutációt is, melyek közül 3 a *Fes* gén mutáns alléljának bizonyult, míg további 3 mutáció - melyek mindegyike a *PcG* mutánsainak enhanszerként viselkedik - egy korábban ismeretlen komplementációs csoportot alkot.

A *Pis* és a *Fes* gének közvetlenül hatnak az *iab-7* PRE szakaszon. A *Pis* erős Fab-7<sup>2</sup> enhanszerként viselkedik, míg a *Fes* szuppresszora a Fab-7<sup>2</sup> fenotípusnak. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a PIS és a FES fehérjék fontos szerepet töltenek be az *iab-7* PRE szakaszon működő fehérjekomplexekben.

A *Pis* gén allélikusnak bizonyult az egyik POLYCOMB-fehérjék által alkotott komplex, a PHORC (PHO Repressive Complex) hiszton-kötő tagjának, a DSFMBT fehérjének génjével. Kimutatták, hogy a DSFMBT fehérje MBT-doménje a H3 hiszton K9 aminosavának és a H4 hiszton K20 aminosavának mono- és dimetilált formájához köt, de nem ismeri fel sem a trimetilált, sem a metilálatlan formákat. Megfigyeléseink, melyek szerint a *Pis* alléljai a

*Polycomb*-csoport tagjaihoz hasonló genetikai interakciókat mutatnak, alátámasztják a biokémiai adatokat.

A *Fes* allélok világosító hatása specifikus az *iab-7* PRE szakaszra (nem hatnak az *Mcp* PRE-t tartalmazó transzgenikus konstrukcióra). A *Fes* genetikai interakciói szintén arra utalnak, hogy a FES fehérje a TRITHORAX-csoport egy eddig ismeretlen tagja.

Mivel *Fes* (és *bon*) allélokat a csupán minimál PRE-t tartalmazó 102.103.2 vonal háttérében is sikerült azonosítanunk, lehetségesnek látszik, hogy az *iab-7* PRE közvetlen közelében, vagy azzal átfedve egy TRE-jellegű FRE (Fes Response Element) szakasz helyezkedik el. Az FRE, bár hasonló működésű, mint a TRE, sok szempontból különbözik is attól: például a *trx* és az *ash1* (*absent, small or homeotic discs 1*) gének termékei valószínűleg nincsenek jelen ezen a DNS szakaszon.

Nem kizárható, hogy az általunk izolált *Fes* allélok mind funkciónyerések; ebben az esetben elképzelhető, hogy az antimorf FES fehérje gátolja az *iab-7* PRE szakaszon kialakuló POLYCOMB-komplex működését.

Az a felismerés, hogy számos gén (*Psc*, *Su(Pc)37D*, *vtd*) funkcióvesztéses mutációi a várttal ellentétes módon változtatják meg a transzgenikus szemszín, arra utal, hogy a POLYCOMB- és TRITHORAX-fehérjék bonyolult szabályozási hálózatot alkotva saját génjük, illetve más *Polycomb*- és *trithorax*-gének transzkripciószabályozóiként működhetnek.

A funkciónyeréses *bon*<sup>117</sup> mutációval végzett kísérleteink során bebizonyosodott, hogy a *bon* (92F2-92F3) a *trxG* tagja. A szemszín erősen sötétítő, ugyanakkor trithorax-jellegű homeotikus fenotípust mutató *bon*<sup>117A</sup> allél revertálhatónak bizonyult. A revertánsok, valamint a *bon*<sup>249/12</sup> mutánsban található P-elem mobilizálásával nyert funkcióvesztéses allélok a transzgenikus konstrukciók háttérében trithorax-jellegű (szemszín világosító) fenotípust mutatnak. A *bon* allélok interakciót mutatnak a *trx* gén deléciójával, ami arra utal, hogy a két fehérje esetleg kölcsönhatásba léphet egymással.

A *gpp* gént korábban laboratóriumunkban már azonosították, a *gpp*<sup>94A</sup> revertánsainak kromoszómális töréspontjai azonban segítettek a gén klónozásában. A *gpp* (83E6-83E7) a *trithorax*-csoport új tagja. Míg a funkcionyeréses *gpp*<sup>94A</sup> allél a 18.73.1 vonal szemszínét erősen sötétíti, a revertánsok nincsenek hatással a szemszínre. A *gpp* változatos interakciókat mutat a *Polycomb*-csoport tagjaival: a *gpp*<sup>1A</sup> erősíti a *Sex combs extra* (*Sce*), a *Pcl* és a *Scm* fenotípusát, a *gpp*<sup>94A</sup> viszont szuppresszálja ezeket a mutációkat.

Az együttműködő laboratóriummal közös eredményeink alapján a GPP fehérje az élesztő DOT1 fehérjével homológ, és ennek megfelelően a *Drosophila* H3 hisztonjának K79 metiltranszferáza.

Kísérleteink során *msl*-típusú mutációkat is azonosítottunk. Valószínűsítjük, hogy ezek a mutációk a *white enhancer*-t és *miniwhite* riportergént tartalmazó konstrukciókon érvényesülő ektopikus dóziskompenzáción keresztül fejtik ki hatásukat. Egyelőre nem ismert, hogy ezen mutációk által kijelölt gének termékei kölcsönhatásba lépnek-e a PCG és a TRXG fehérjével.

Mutagenesis kísérleteink eredményesnek bizonyultak, hiszen nem csupán a *Polycomb*- és a *trithorax*-csoport új tagjait sikerült azonosítanunk, hanem információt nyertünk az *iab-7* PRE szakaszon megvalósuló gátlás természetéről is. Megtudtuk, hogy nincs szükség minden PCG fehérjére a gátlás létrejöttéhez. A PC fehérjének például valószínűleg nem a párosodó PRE szakaszok interakciójában van fontos szerepe, hanem az elsődleges PRE szakaszok és a másodlagos, PRE-jellegű DNS szakaszok közötti kapcsolat kialakításában.

Mivel laboratóriumunk korábbi eredményei valószínűsítik, hogy az *iab-7* PRE szakasztól távolabb, a *Fab-7-iab-7* PRE régió MvaI-HindIII (~1200 bp) fragmentjében, de az ApaI-XbaI fragmenten kívül egy TRE is található, új transzgenikus konstrukciókat terveztünk. Ezen konstrukciók egyike csak a központi ApaI-BalI fragmentumot tartalmazza (ez lényegében megfelel a 18.73.1 vonalban megtalálható ApaI-XbaI fragmentnek), egy a

teljes MvaI-HindIII szakaszt magában foglalja, kettő pedig a központi szakaszon kívül csak az egyik, illetve másik oldali szakaszt tartalmazza (ApaI-HindIII és MvaI-Ball).

Az általunk tervezett négy átfedő konstrukció segítségével a jövőben szeretnénk megállapítani az említett valószínűsíthető TRE pozícióját. Mivel konstrukcióinkban a PRE-szakasz FRT (Flip Recombinase Target) szekvenciák közé klónozva helyezkedik el, lehetőség nyílik arra is, hogy a beépülések közül kiválaszthassuk azokat, amelyek esetében a bennük található PRE-szakasz nem lép kölcsönhatásba genomikus PRE-szakaszokkal, tehát valóban izoláltan működik.

Reményeink szerint a jövőben az általunk izolált mutációk és az elkészített konstrukciók segítségével lehetővé válik a *Fab-7-iab-7* PRE régió PRE- és TRE-jellegű DNS szakaszainak finomtérképezése.

## SUMMARY

Segmental identity in *Drosophila melanogaster* is determined by two clusters of homeotic genes, the *Antennapedia*- (ANT-C) and the *bithorax*-complexes (BX-C). The complex expression pattern of the BX-C genes is due to the action of nine parasegment-specific *cis*-regulatory domains. The activity patterns of these *cis*-regulatory regions are set early in development by protein products of segmentation genes. By mid-embryogenesis, when the products of the segmentation genes disappear, the regulation of the homeotic genes switches to a maintenance mode that preserves the initial pattern of activity throughout the remainder of development.

Maintenance of the inactive state requires the action of the POLYCOMB-group (PCG) of proteins. By contrast, the *trithorax*-group (*trxG*) of genes is responsible for maintaining the active state of homeotic genes. PCG proteins function cooperatively and form multimeric repressor complexes, which are tethered to the DNA at sequences called Polycomb Response Elements (PRE). The antagonistic activities of TRXG and PCG proteins involve modulation of chromatin structure.

Special homeotic phenotypes and genetic interactions help the isolation of new mutations in *PcG* and *trxG* genes. Although the number of *PcG* genes was estimated to be 40 previously, only 15 *PcG* members were found in traditional screens.

Our first aim was to identify new members of the *PcG* and the *trxG* using transgenic lines which contain a PRE between a reporter gene (*white*) and its enhancer. Transgenic lines containing *iab-7* PRE fragments show pairing-sensitive silencing of the *miniwhite* reporter gene: the eye-colour of transgenic flies is lighter in homozygous than in heterozygous conditions. This silencing effect is weakened by introducing a *PcG* mutation, while it is strengthened in a *trxG* mutant background.

We used two transgenic constructs containing two different *iab-7* PRE fragments for large scale screens to identify previously unknown *PcG* and *trxG* genes. One of the transgenic lines we used was the *18.73.1* containing the *ApaI-XbaI* fragment of the *Fab-7* region, the other was the *102.103.2* covering only the minimal PRE sequence (HS3; 260 bp) of the same region. We also used two different mutagenizing methods, EMS and X-rays on the lines *18.73.1* and *102.103.2*, respectively. Darkeners of the eye-colour were supposed to be members of the *PcG*, while lighteners were considered to belong to the *trxG*. We expected to recover mostly loss-of-function mutations in the X-rays-induced mutagenization experiment, while we expected more gain-of-function alleles from the EMS-induced screen.

In our screens, we isolated 1 allele of *Suppressor of Polycomb at 37D* (*Su(Pc)37D*), 3 alleles of *wingless* (*wg*), 13 alleles of *Polycomblike* (*Pcl*), 1 allele of *Suppressor of zeste 12* (*Su(z)12*), 3 alleles of *Posterior sex combs* (*Psc*), 15 alleles of *Sex comb on midleg* (*Scm*), 1 allele of *verthandi* (*vtd*), 3 alleles of *kohtalo2* (*kto2*; a gene that is localized in the region covered by the *Df(3L)kto2*), 1 allele of *Suppressor of zeste 2* (*Su(z)2*) and 2 *male-specific lethal-type* (*msl*) alleles. We also identified 2 previously unknown complementation groups, which we named *Fehér szem* (*Fes*; 3 alleles) and *Piros szem* (*Pis*; 8 alleles).

The X-rays-induced reversion of mutants showing controversial phenotypes (trithorax-type homeotic phenotype, while darkening the eye-colour) revealed that we also isolated gain-of-function alleles of *grappa* (*gpp*) and *bonus* (*bon*). Complementation analysis showed that 4 of the newly identified lightener mutations on the 3<sup>rd</sup> chromosome were loss-of-function *bon* alleles. Reversion screens yielded an additional advantage of gaining lightener mutations as suppressors of the gain-of-function darkeners. In these screens – among previously unidentified distinct complementation groups - we isolated 3 more alleles of *Fes*, and a previously unidentified lightener gene represented by three alleles (which proved to be enhancers of known *Polycomb*-group mutations).

Additionally, in the background of the *18.73.1* line we isolated 35 unknown complementation groups, each of which is represented by only one allele. Using the *102.103.2* line we isolated 50 new mutations that complement the alleles of all the previously known mutations. As the latter line was mutagenized by X-rays, we could observe chromosomal rearrangements that might be responsible for the phenotypes.

*Pis* (a strong darkener) and *Fes* (a strong lightener) mutations seem to act directly on the *iab-7* PRE. *Pis* is a strong Fab-7<sup>2</sup> enhancer, while *Fes* is a suppressor of the Fab-7<sup>2</sup> phenotype. These results show that PIS and FES proteins may have crucial roles in the complexes tethered to the *iab-7* PRE.

After the PHORC (PHO Repressive Complex) was isolated, *Pis* proved to be allelic to the gene encoding the DSFMBT histone-binding protein of the complex. The MBT domain of DSFMBT has a unique discriminatory binding activity for methylated lysine residues in histones H3 and H4; the MBT repeats bind mono- and di-methylated H3-K9 and H4-K20 but fail to interact with these residues if they are unmodified or tri-methylated.

FES may have a role of the same importance as PIS, but on the antagonistic (TRXG) side. Although it is rather difficult to interpret the complementational behaviour of the alleles, we proved that *Fes* is a new member of the *trxG*, and it is specific to the *iab-7* PRE. The fact that we could isolate lightener mutations (*Fes*, *bon*) using the minimal PRE containing *102.103.2* line indicates that a TRE-like (Trithorax Response Element) sequence is overlapping or located very close to the *iab-7* PRE. This sequence is not a typical TRE, because the eye-colour of the *102.103.2* transgene does not respond to the mutations of *trithorax* (*trx*) and *absent, small or homeotic discs 1* (*ash1*). Therefore we termed this sequence FRE (Fes Response Element). We could not exclude the possibility that all of our *Fes* mutations are gain-of-function alleles. In this case, the antimorphic mutant FES protein might antagonize the function of the POLYCOMB-complex tethered to the *iab-7* PRE.

Some of our mutants were definitely loss-of-function contrary to their controversial phenotypes (*Psc*, *Su(Pc)37D*, *vtd*). This finding – taken together with other observations – demonstrates a regulatory network between the members of the *PcG* and the *trxG*.

The *bon*<sup>117A</sup> allele (a gain-of-function allele of *bon*) helped us demonstrate that the previously known *bon* gene (location: 92F2-92F3) is a member of the *trxG*. *bon*<sup>117A</sup>, being a strong darkener contrary to the trithorax-type homeotic phenotype, was revertable. All the revertants are lighteners of the eye-colour of both the *18.73.1* and *102.103.2* lines. We also generated loss-of-function (lightener) alleles by mobilizing the P-element insertion in the *bon*<sup>249/12</sup> mutant line.

*bon* alleles show dominant interaction with *trx*, indicating that the two proteins may interact. *bon* mutants proved to be lighteners of the transgenic eye-colour only if the transgene contains the *white enhancer*, though the presence of the PRE is also necessary to set the activity of the reporter gene.

We also isolated a gain-of-function *gpp* allele (*gpp*<sup>94A</sup>), which we were able to revert using X-rays. *gpp*<sup>94A</sup> is a strong darkener of the *18.73.1* transgenic constructs, while the revertants have normal orange eye-colour. *gpp* mutants show different interactions with alleles of genes belonging to the *Polycomb*-group: *gpp*<sup>1A</sup> is an enhancer of *Sex combs extra* (*Sce*), *Pcl* and *Scm*, while *gpp*<sup>94A</sup> shows suppression of these mutations.

The first allele of *gpp* was also isolated in our laboratory, and the revertants of *gpp*<sup>94A</sup> helped in cloning the gene. *gpp* is a new member of the *trxG*, and it is located in the cytological region 83E6-83E7. The N-terminal domain of the GPP protein shows significant homology to the DOT1 protein of *S. cerevisiae*. GPP, like its homologue, proved to be a H3 histone K79 methyl-transferase, having possible transcriptional effects during embryogenesis.

Our screens also yielded alleles of *msl*-type genes. Though we do not know whether the products of these genes interact with the PCG and TRXG proteins, we suppose that the



mutation of these genes act through the autonomous dosage compensation of the *white* reporter gene.

Our screens helped us gain information on the specific features of POLYCOMB-dependent silencing as well. Our findings imply that not all the PCG members are necessary for the silencing activity of the *iab-7* PRE. We did not identify either *Polycomb* (*Pc*) or *Enhancer of zeste* (*E(z)*) alleles. This finding is in correlation with the model that the main function of POLYCOMB is rather connecting PREs to subsidiary PRE-like sequences than tethering homologous PREs to each other.

Our previous experiments suggest that there may be a TRE-like sequence outside the *ApaI-XbaI* fragment, but inside the *MvaI-HindIII* fragment of the *Fab-7* region. We plan to localize this TRE in the future, therefore we designed 4 transgenic constructs, which are supposed to help us in this work. One of these constructs contains only the *ApaI-Ball* fragment (almost the same as the *18.73.1*), one is longer to the left side (*MvaI-Ball*), one is longer to the right side (*ApaI-HindIII*), and one of the constructs contain the full *MvaI-HindIII* region. To avoid interactions between the reporter gene enhancer and the *iab-7* PRE we cloned the PRE fragments into plasmids containing the white reporter gene without its enhancer. We also inserted FRT sites flanking the PRE in order to make it easier to select lines showing pairing-sensitive silencing without the transgenic PRE being involved in any interactions of endogenic PRE sequences.

We hope that our newly isolated mutants and our new PRE-containing transgenic constructs will help us in fine-mapping the POLYCOMB- and TRITHORAX-complex tethering sequences of the *Fab-7-iab-7* PRE region.